

**Contribution à l'étude
de l'agglutination des Bactéries
par les sucs végétaux**

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA
FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION PHARMACIE)

PAR

Marie-Antoinette RENAUX

Née le 14 Janvier 1910, à Damvillers (Meuse)

Soutenue le 28 Janvier 1936

Examineurs. . . {	MM. LASSEUR	Président.
	VERNIER	Juges.
	MARCHAL	

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1936

**Contribution à l'étude
de l'agglutination des Bactéries
par les sucs végétaux**

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA
FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION PHARMACIE)

PAR

Marie-Antoinette RENAUX

Née le 14 Janvier 1910, à Damvillers (Meuse)

Soutenue le 28 Janvier 1936

Examineurs. . . {	MM. LASSEUR	<i>Président.</i>
	VERNIER	} <i>Juges.</i>
	MARCHAL	

NANCY
SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES
1936

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE:

M. BRUNTZ, O. ✱, ✎, I ✎, O. ✎, ✕, ✕, Recteur de l'Université de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES:

MM. GRÉLOT, ✱, I ✎, ✎.

BRUNTZ, O. ✱, ✎, I ✎, O. ✎, ✕, ✕

DOYEN HONORAIRE:

M. SEYOT, ✱, ✎, I ✎, ✎, ✕

DOYEN:

M. PASTUREAU, O ✱, I ✎, ✕

ASSESEUR:

M. LASSEUR, ✱, I ✎, ✎.

PROFESSEURS:

MM. DOURIS, I ✎, ✎, ✕.....	Toxicologie.
PASTUREAU, O ✱, I ✎, ✕.	Pharmacie chimique.
SEYOT, ✱, ✎, I ✎, ✎, ✕.	Histoire naturelle.
LASSEUR, ✱, I ✎, ✎.....	Microbiologie.
PRÉVOST, ✎, ✎.....	Chimie organique.
N.....	Matière médicale.
N.....	Pharmacie galénique.

AGRÉGÉ LIBRE:

M. GIRARDET, ✱, I ✎..... Chimie et Toxicologie.

CHARGÉS DE COURS MAGISTRAUX:

M. MEUNIER..... Pharmacie galénique.
Mlle FRANÇOIS..... Matière médicale.

CHARGÉS DE COURS:

MM. VERNIER, I ✎..... Zoologie.
CORDEBARD, I ✎, ✎..... Analyse chimique.
DONZELOT..... Physique.
MARCHAL..... Hydrologie.

CHEFS DE TRAVAUX:

MM. VERNIER, I ✎..... Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD, I ✎, ✎..... Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ..... Micrographie.
DONZELOT (chargé de travaux)..... Physique.
RICHARD (chargé de travaux)..... Pharmacie.
PY (chargé de travaux)..... Chimie biologique et Toxicologie.

SECRÉTARIAT:

M. E. TRIBOLET, I ✎..... Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MES PARENTS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LASSEUR

Avant-Propos

En commençant l'exposé de notre modeste travail, notre pensée se reporte vers tous ceux qui nous ont permis d'en poursuivre la réalisation.

Nous avons contracté une dette de particulière gratitude envers Monsieur le Professeur Lasseur qui nous accueillit, voici quelques années, dans son Laboratoire. Monsieur le Professeur Lasseur nous proposa le sujet de ces recherches, voulut bien suivre de très près la marche de notre expérimentation, contrôler tous nos résultats et nous aider à les interpréter. Nous prions Monsieur le Professeur Lasseur d'agréer l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Doyen Gillot, qu'une mort prématurée a frappé en pleine activité scientifique, nous avait très obligeamment offert son Laboratoire pour différentes manipulations. C'est avec émotion et gratitude que nous évoquons sa mémoire.

Nous remercions très profondément Monsieur le Professeur Cordebard de la bonté qu'il nous a toujours témoignée.

Monsieur le Docteur Vernier et Monsieur Marchal, qui ont eu pour nous beaucoup de bienveillance durant notre séjour au Laboratoire, nous ont fait l'honneur de juger ce travail. Nous leur adressons nos vifs remerciements.

Nous avons effectué la plupart de nos expériences avec Madame Lasseur. Nous garderons d'elle non seulement le souvenir d'un guide qui nous fut précieux par son érudition jointe à une grande sûreté de technique, mais aussi le sou-

venir d'une amie très bonne. Nous lui exprimons ici toute notre reconnaissance.

Nous ne saurions oublier Mlle Grosjean, Mlle Babou et M. Rehn qui nous ont aidée dans notre travail avec une constante bonne grâce à laquelle nous avons été très sensible.

Nos sincères remerciements à M. Sacchetti pour sa grande complaisance.

Introduction

On sait que tout organisme animal est en mesure de se défendre contre un agent infectant au moyen de processus divers, parmi lesquels des réactions humorales; de façon générale, il répond à l'introduction d'un antigène quelconque par la formation d'anticorps correspondants. Si l'antigène est constitué par une Bactérie qui a été injectée à l'animal à doses croissantes, on constate que les humeurs et, plus spécialement, le sérum de cet animal ont acquis des propriétés particulières, parmi lesquelles un pouvoir agglutinant vis-à-vis de la Bactérie inoculée. On attribue ce pouvoir agglutinant à une substance qui se serait développée dans le sérum au cours de la préparation de l'animal, substance désignée sous le nom d'agglutinine.

Le phénomène de l'agglutination a été découvert en 1889 par CHARRIN et ROGER qui ont observé et décrit l'aspect caractéristique des cultures du Bacille pyocyanique en milieu additionné de sérum de Lapin vacciné. Ces germes qui, normalement se présentent en plastides isolées ou en diplo, et troublent uniformément le bouillon, forment, s'ils sont cultivés dans un tel sérum, un dépôt de corps bactériens surmonté d'un liquide clair. Observé au microscope, ce dépôt apparaît constitué, non plus de plastides isolées mais de plastides réunies en amas, agglutinées.

L'observation de CHARRIN et ROGER a été le point de départ d'innombrables travaux, destinés tant à approfondir le mécanisme de l'agglutination qu'à déterminer les propriétés de la substance agglutinante. Mais le phénomène de l'agglutination n'a jamais pu être observé *in vivo*, et on ignore encore s'il joue un rôle précis dans la défense de l'organisme. On le considère comme accompagnant généralement un

état d'immunité plus ou moins absolue, dont il est, en quelque sorte, le témoin, décelable *in vitro*.

L'immunité naturelle ou acquise est une propriété commune à tous les êtres vivants, et dont les Végétaux aussi bien que les Animaux peuvent être doués. Mais, tandis que nous possédons sur le problème de l'immunité animale des données étendues, nous permettant d'en avoir une vue d'ensemble, nous en sommes encore dans l'étude de l'immunité végétale à la période de tâtonnements du début.

Pourtant, l'observation des maladies des Végétaux est fort ancienne, et le rôle des Bactéries comme agent de certaines affections végétales s'est établi dans les dernières années du XIX^e siècle, avec les travaux de BURRIL (1877), PRILLIEUX (1878 et 1879), WAKKER (1883 et 1889), O. COMES (1884), J. C. ARTHUR (1886), SAVASTANO (1887), NOACK (1893). Mais les recherches concernant le mécanisme de l'infection et les moyens de défense de la plante sont restées longtemps assez superficielles. Il faut arriver à 1895 pour trouver dans le « Traité de Pathologie générale » de BOUCHARD un chapitre de Pathologie végétale, dû à l'illustre savant VUILLEMIN, qui apporte des vues nouvelles et hardies sur l'immunité végétale, étudie pour la première fois les réactions de l'organisme atteint et définit les maladies de l'irritabilité; l'irritabilité étant une « *propriété inhérente à tout protoplasme vivant* ». Vers la même époque, en 1901, BEAUVÉRIE et RAY tentent avec succès des essais d'immunisation des plantes, comparables à la vaccination animale. Un peu plus tard, le mécanisme des phénomènes que GALLAUD (1905) avait déjà définis en les nommant « *phagocytose sur place* » est magistralement exposé par Noël BERNARD (1909), qui n'hésite pas, en outre, à comparer à une véritable agglutination le pelotonnement des filaments mycéliens dans les cellules phagocytes des Orchidées. Après Noël BERNARD, les chercheurs allaient, dans l'étude de l'immunité végétale, s'inspirer des données de la pathologie animale, suivant ainsi la voie indiquée par VUILLEMIN: « *Il existe en pathologie végétale un facteur humoral ou en tout*

cas une série d'altérations directement comparables aux changements de composition des humeurs de l'homme. »

Un tel rapprochement est, certes, très séduisant car il satisfait le besoin qu'a l'esprit de retrouver sous les apparences diverses les mêmes lois fondamentales, et s'accorde avec l'identité profonde qui existe entre les manifestations essentielles de tous les êtres vivants, qu'ils appartiennent au règne végétal ou au règne animal.

Cependant, depuis l'époque où VUILLEMIN prévoyait « *le jour où il n'y aura qu'une pathologie comme il n'y a qu'une biologie* », et malgré les recherches tendant à mettre en lumière les réactions humorales des plantes, les résultats acquis demeurent encore partiels et controversés.

Contre l'hypothèse même de réactions humorales chez les Végétaux, plusieurs objectent *a priori* les différences anatomiques et physiologiques qui existent entre les deux règnes animal et végétal. Pour ces auteurs, la localisation habituelle des maladies des plantes ne permettrait pas d'envisager une immunisation générale telle que celle qui est liée à un facteur humoral, celui-ci étant, du reste, incompatible avec l'absence de système circulatoire chez les plantes.

Les plantes, en effet, ne possèdent pas de courant circulatoire dans un système clos comme celui des Animaux, qui transporte et diffuse dans tout l'organisme l'antigène introduit et les anticorps élaborés. Cette particularité n'exclut pas cependant pour la plante la possibilité de réactions humorales, car on a observé que les tissus animaux cultivés *in vitro* ⁽¹⁾ sont capables d'élaborer des anticorps spécifiques: la production des anticorps est liée seulement à l'activité cellulaire, elle est décelable même en l'absence de système circulatoire sanguin. D'autre part, la circulation de la sève dans les plantes n'est pas aussi simple que le schéma généralement décrit. Le mouvement ascendant de la sève brute, descendant de la sève élaborée peut être inversé dans certains

(1) C'est au savant CARREL que sont dues les premières cultures *in vitro* de tissus animaux.

cas, comme l'ont démontré de récentes recherches. Il existe aussi des courants transversaux, et les échanges de cellule à cellule ne sont pas négligeables. Enfin, des expériences assez nombreuses ont apporté la preuve incontestable de l'absorption totale et rapide par la plante de substances de composition chimique déterminée ou très complexes, telles que les substances protéiques. KRAUS, von PORTHEIM et YAMANOUCHI (1901) ont cultivé des plantes dans un liquide additionné de sérum. Au moyen de la réaction de précipitation effectuée sur l'extrait de ces plantes, les auteurs ont constaté que celles-ci avaient absorbé une certaine quantité de substances protéiques de sérum. En injectant à des Fèves, à l'aide d'une seringue munie d'aiguille, un liquide coloré au rouge neutre, NOBÉCOURT (1928) a pu observer que les tissus de la plante étaient fortement teintés en rouge dans toute leur épaisseur. Enfin, ARNAUDI a réussi à guérir du cancer végétal des rameaux de Géranium en faisant séjourner ceux-ci dans de l'eau additionnée de sérum de Lapin anti-*Bact. tumefaciens*. Ce beau résultat démontre clairement que les anticorps du sérum ont circulé dans les rameaux traités.

Quant à l'objection qui repose sur la localisation des maladies végétales, elle ne tient compte que de quelques faits et en néglige de nombreux et importants. Si, en effet, certaines lésions telles que les galles n'ont que peu d'influence sur l'état général de l'organisme de la plante, dans nombre de cas, au contraire, la présence d'un parasite en un point provoque un trouble physiologique manifeste dans tout l'appareil végétatif et reproducteur. Ce retentissement sur tout l'organisme d'une perturbation locale ne peut être due qu'aux « *altérations du milieu commun qui baigne les cellules... parfois considérables, frappantes ou même prépondérantes* » (VUILLEMIN). En 1887, déjà, BÖHM remarquait l'élévation de l'acidité chez les plantes blessées, et WAGNER en 1916 a noté avec précision les pH différents du suc cellulaire au cours de l'évolution d'une maladie. Les recherches de GIOELLI (1927) montrent de même les variations de la teneur en protéines du suc de plantes malades.

Sans qu'il soit nécessaire d'engager une discussion théorique, les exemples qui précèdent prouvent assez que sont mal fondées les objections émises contre la possibilité pour l'organisme végétal de modifications humorales. Il n'est donc pas irrationnel de chercher à provoquer par introduction d'antigène, et mettre en évidence chez la plante la formation de substances analogues à celles qu'on observe chez les animaux vaccinés : sensibilisatrices, précipitines, agglutinines. Ce sont ces dernières, les agglutinines dont la recherche nous a tenté plus spécialement et fait l'objet de cette étude. La réaction de l'agglutination est parmi les réactions humorales une des plus nettes et des plus facilement observables. De plus et surtout, le laboratoire où ce travail a été effectué est en quelque sorte spécialisé dans l'étude de l'agglutination sérique. Notre Maître, M. le Professeur LASSEUR, qui nous a constamment dirigée au cours de nos recherches, étudie depuis près de 25 ans le mécanisme de ce phénomène, ses facteurs physico-chimiques et a fait porter une partie de son activité sur l'étude des agglutinines végétales. Nous ne pouvions trouver de guide plus autorisé et plus sûr pour explorer un domaine presque neuf et nous éviter, autant que possible, les erreurs où nous n'aurions pas manqué de tomber tant à cause de notre inexpérience que des difficultés du sujet.

Une fois admise, en effet, l'hypothèse des agglutinines végétales, leur recherche n'est pas sans présenter plusieurs complications. Le liquide végétal employé dans la réaction d'agglutination est, en général, le suc obtenu par pression des différents organes de la plante. Il serait, selon plusieurs auteurs, inutilisable pour une expérimentation sérieuse, car il ne représente ni la sève qui circule dans les vaisseaux, ni le suc cellulaire à l'état pur. C'est un mélange complexe de substances qui ne sont pas en contact dans l'organisme et dont les propriétés peuvent être profondément modifiées au cours de l'extraction et des différentes manipulations qu'il subit. Cette objection peut paraître grave, et cependant le sérum animal sur lequel sont effectuées de semblables re-

cherches constitue lui aussi quelque chose d'artificiel. Ses constantes physico-chimiques ne sont pas celles du plasma. De plus, de nombreux globules rouges, des globules blancs sont lysés pendant les opérations que nécessite l'obtention du sang et laissent diffuser dans le sérum des substances qui en sont séparées dans l'organisme vivant. Or, malgré ces différences notables entre le « sérum vivant » et le sérum *in vitro*, les réactions effectuées couramment sur celui-ci donnent des résultats satisfaisants et reconnus valables.

Il ne semble donc pas impossible d'expérimenter avec succès sur un suc obtenu par pression du végétal. D'ailleurs, nous avons eu soin, chaque fois qu'il était possible, d'instituer des séries témoins comportant un suc extrait dans de meilleures conditions et, par conséquent, moins différent du liquide circulant dans la plante.

Une autre difficulté surgit qui tient à l'acidité généralement assez élevée des sucs végétaux. MALVOZ (1897) a montré que l'agglutination des microbes ne se produit pas seulement en présence des sérums d'animaux vaccinés mais aussi bien sous l'action de substances chimiques. Ce phénomène dont MICHAELIS a donné l'expression quantitative a été généralisé par un grand nombre de travaux, et on sait que les Bactéries sont agglutinées par les ions à charge positive et particulièrement les ions H^+ . L'addition d'ions positifs à une suspension bactérienne, abaisse la charge négative des plastides jusqu'à une certaine différence de potentiel critique, de sorte que les Bactéries soumises aux seules forces d'attraction précipitent.

Il faut craindre, par conséquent, dans la recherche d'agglutinines végétales, de voir la réaction humorale simulée ou masquée par une réaction purement physico-chimique, une agglutination acide. On risque d'assister soit à ce dernier mécanisme seul, soit à la superposition des deux phénomènes.

Connaissant cette cause d'erreur possible, nous avons été quelque peu étonnée par les conclusions d'un travail paru en 1933, où son auteur, G. VISCO semble attribuer à un anticorps l'agglutination des Bactéries par le suc d'un fruit

d'acidité bien connue, le Citron. Aussi avons-nous été tentée de reprendre cette question afin de confirmer ou d'infirmer les résultats du savant italien. Partie de là, nous avons élargi notre expérimentation à d'autres espèces végétales dans lesquelles nous avons: 1° cherché les agglutinines pouvant y exister normalement; 2° essayé d'en provoquer la formation au moyen d'inoculations bactériennes.

Cet ouvrage est divisé en deux parties.

Dans la première, nous donnons d'abord un bref aperçu des différentes sortes de réactions mises en jeu par la plante pour se défendre contre les maladies infectieuses. Nous décrivons ensuite les principaux essais d'immunisation végétale. Enfin, nous exposons de façon aussi complète que possible l'historique du problème qui touche directement à notre travail: les anticorps chez les Végétaux.

La deuxième partie est consacrée à nos recherches personnelles. Le premier chapitre décrit l'agglutination des Bactéries par le suc de Citron. Au deuxième, nous relatons les essais destinés à mettre en évidence des agglutinines normales et spécifiques chez *Begonia*, *Anthemis* et *Clivia*.

Un résumé de nos principales observations termine cette étude.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Quelques facteurs et réactions immunitaires chez les Végétaux

Avant d'analyser les travaux ayant trait aux réactions humorales chez les Végétaux, peut-être n'est-il pas inutile de dire quelques mots des autres mécanismes qui jouent un rôle plus ou moins important dans la défense des plantes vis-à-vis des maladies parasitaires.

Les premières théories émises pour expliquer l'immunité ou la réceptivité des Végétaux invoquaient surtout des facteurs chimiques.

Pour LAURENT (1893), AVERNA SACCA (1910), COMES (1912), SCURTI et SICCA (1915), KIRCHNER (1916), etc., la présence dans le suc des plantes de certaines substances chimiquement définies diminuerait leur résistance, tandis que d'autres, en particulier les composés acides, l'augmenteraient.

Mais de telles conditions, si elles rendent compte de quelques faits, sont loin d'être généralisables, comme l'ont démontré les travaux de VAVILOV (1918), PANTANELLI (1921), Miss HURD (1923), ARRHÉNIUS (1924), HURSH (1924).

Une idée un peu différente est celle de PFEFFER, MIYOSHI (1894), MASSEE (1904), SCHMIDT (1909), PETRI (1909), pour qui les plantes seraient réceptives ou immunes envers

un parasite donné suivant qu'elles renferment des substances douées de chimiotropisme positif ou négatif pour ce parasite. Mais les expériences de Miss GIBSON (1904), FULTON (1906), Miss ALLEN (1923), etc., ne cadrent nullement avec cette hypothèse.

L'obstacle présenté à l'introduction du parasite par l'épiderme et la cuticule du végétal serait, selon COBB (1890-1892) et FARRER (1898), un facteur important de défense. En réalité, il ne joue qu'un rôle très restreint.

D'ailleurs, des obstacles mécaniques comme aussi les propriétés chimiques des sucres représentent les facteurs d'une immunité en quelque sorte passive, et il est logique de supposer chez la plante des réactions immunitaires vitales. Telles sont celles qui entrent en jeu lorsque la plante a déjà subi un commencement d'infection, et pour en limiter, avec plus ou moins de succès, le développement. Dans ce cas, l'organisme végétal jouit d'une activité particulière qui se manifeste par des modifications de composition de ses sucres, des sécrétions exagérées ou anormales de pigments, tanins, cristaux, composés phénoliques, etc. (TOBLER, 1917; CARBONE, 1919; VAN DER VOLK, 1922; GIOELLI, 1927, DUFRÉNOY, 1931-32), et par des modifications cytohistologiques importantes (TISDALE, 1917; MANZONI, 1922; VAN DER VOLK, 1922; ZOJA, 1924; MONTEMARTINI, 1927; CARBONE et ARATA, 1934; KALAJEV, KRAVTCHENKO et SMIRNOVA, 1935; ARATA, 1935). On observe des déformations et une augmentation de volume des noyaux cellulaires (déjà notées par VUILLEMIN), des altérations ou transformations des plastes, mitochondries, vacuoles. La division cellulaire s'intensifie pour former dans la région envahie ou en arrière de celle-ci une ou plusieurs assises de cellules subérifiées: c'est l'immunité dite « *de barrière* » ⁽¹⁾. Dans quelques cas, la réaction histogène va jusqu'à la formation de néoplasmes, galles (MAL-

(1) L'expression « *immunité de barrière* » a été employée pour la première fois en immunologie animale par le savant italien BELFANTI, Directeur de l'Institut Sérothérapique de Milan.

PIGHI), tumeurs ⁽¹⁾, ou même jusqu'à l'auto-amputation de la partie infectée. Mais on peut se demander quel est le mécanisme intime de cette activité anormale. VUILLEMIN pensait que « *La formation des galles procède d'une irritation dont on trouve l'origine dans les altérations humorales provenant des produits de sécrétion des insectes* ». La cause initiale serait donc le parasite. Pour BEYERINCK et SACHS, l'accroissement normal du Végétal procéderait de substances fluides et diffusibles; en cas d'infection, l'antagonisme entre ces substances et la substance émise par le parasite provoquerait les divisions pathologiques. D'après HABERLANDT (1922) le principe stimulant la défense est inhérent à la plante; ce serait une « hormone de désintégration », « *Zellteilungshormone* ».

Des réactions histocytologiques d'immunité végétale on peut rapprocher un mécanisme très important, découvert chez les animaux par METCHNIKOFF et dont l'existence est maintenant indéniablement démontrée chez les plantes: la phagocytose. Ce processus de défense n'a été observé jusqu'ici que dans les associations harmoniques nommées symbioses, mais on peut estimer avec Noël BERNARD que les symbioses (qu'on a coutume d'opposer aux maladies parasitaires), sont, en réalité, « *à la frontière de la maladie* ». Seulement, ce sont des cas de maladie où l'immunité de la plante a fonctionné de façon efficace et leur étude apparaît comme « *un terrain de choix pour la compréhension des lois de l'immunité* » (J. MAGROU).

Ce sont les beaux travaux de Noël BERNARD qui ont mis en lumière les phénomènes de digestion intracellulaire végétale. Quelques auteurs, il est vrai, les avaient déjà remarqués et correctement interprétés, mais il appartenait à N. BERNARD d'en faire une étude précise et approfondie dont les résultats parurent dans plusieurs mémoires désormais classiques (1909).

(1) Les tumeurs provoquées par *Bacterium tumefaciens* ont été particulièrement bien étudiées par ERWIN F. SMITH (1905-1913) et plus récemment par PINOY (1925) et Joseph MAGROU (1924-1927).

Les recherches de ce savant portent sur les Orchidées dont les racines ou rhizomes hébergent des Champignons, du genre *Rhizoctonia*. On observe que les filaments du Champignon, lorsque celui-ci envahit l'embryon d'Orchidée, ne se dirigent pas de façon rectiligne mais se pelotonnent dans chaque cellule. D'autre part, le noyau de certaines cellules envahies s'hypertrophie, prend des formes amoeboïdes, parvient ainsi à digérer les filaments pelotonnés et à les réduire finalement en une masse amorphe. Il y a là une phagocytose évidente qui est le fait de cellules déterminées, spécialisées dans cette fonction. Après N. BERNARD, la phagocytose a été reconnue chez un grand nombre de Végétaux vivant en symbiose, par BURGEFF (1909), ZACH (1910), BEAUVÉRIE (1913, 1926); MOREAU (1920); CARBONE (1922); MULLER (1924); DUFRÉNOY (1929). Les recherches concernant ce phénomène, poursuivies par MAGROU durant plusieurs années (1914-1928), en démontrent l'existence dans diverses espèces (*Solanacées*, *Orob.*, *Mercurialis*, une Hépatique: *Pellia epiphylla*) et en précisent le mécanisme.

Il apparaît bien que les réactions histogènes et phagocytaires jouent un rôle important dans l'immunité végétale. Elles n'en constituent pas cependant les facteurs uniques, ni même essentiels. Les auteurs même qui les ont étudiées de manière approfondie reconnaissent qu'elles sont le plus souvent insuffisantes à elles seules à enrayer l'évolution de l'infection.

Les expériences de NOBÉCOURT (1928) montrent que, dans plusieurs cas, la « barrière » qui paraissait efficace dans la lutte contre le parasite est franchie par lui, dès que la vitalité de la plante atteinte est diminuée. CARBONE et ARATA (1934) admettent l'hypothèse de « substances microbicides sécrétées par les cellules de la barrière de défense sous l'action du stimulus infectieux », et destinées à compléter l'action de cette barrière.

Pour Noël BERNARD, la phagocytose ne remplirait qu'un rôle secondaire, le moyen essentiel de défense étant probablement une propriété humorale. MAGROU, lui aussi, suppose l'existence d'une immunité humorale qui agirait,

comme en pathologie animale, concurremment avec l'immunité phagocytaire.

Etant donnés ces différents facteurs de l'immunité végétale naturelle et, en particulier, l'hypothèse du facteur humoral, de nombreux auteurs ont pensé pouvoir obtenir une immunisation des plantes contre les affections microbiennes. Le chapitre suivant expose les essais effectués dans cette voie.

CHAPITE II

Essais d'immunisation des Végétaux

Parmi les moyens mis en œuvre pour aider la plante dans la lutte contre les maladies infectieuses, les plus anciens consistaient dans l'emploi de substances chimiques à propriétés microbicides. Aujourd'hui, on s'efforce plutôt de faire acquérir une immunité au Végétal en provoquant chez lui des réactions défensives vitales vis-à-vis de l'organisme pathogène. A cet effet, les phytopathologistes utilisent des méthodes qui s'apparentent étroitement à celles dont le succès a pleinement démontré l'efficacité en pathologie animale: la vaccinothérapie et la sérothérapie.

Les essais d'immunisation végétale ne sortent donc pas du domaine qui nous occupe, puisqu'ils s'appuient plus ou moins implicitement sur des réactions humorales supposées chez les Végétaux. On verra cependant que, pour quelques auteurs, d'autres hypothèses que celle d'une théorie humorale rendraient compte des succès remportés dans cette voie.

On sait qu'un animal peut devenir réfractaire à une maladie donnée à la suite d'une première atteinte bénigne de cette maladie, dont il guérit. Des faits analogues ont été observés en pathologie végétale.

HILTNER et STÖRMER (1903) constatent que les Légumineuses dont les racines portent des nodosités dues à l'infection par une souche virulente de *B. radicola* ne sont plus sensibles à des souches de moindre virulence.

Erwin SMITH fait la même remarque pour l'Olivier, atteint de « tuberculose », maladie déterminée par *B. oleae*.

Dans ses expériences sur la symbiose entre les Orchidées et les Rhizoctonia, Noël BERNARD note aussi une vaccination des graines d'Orchidée par un Rhizoctone faiblement pathogène.

ARNAUDI (1925) observe qu'une inoculation de *Bact. tumefaciens* à des rameaux de *Pelargonium zonale*, porteurs de tumeurs dues à ce germe, n'entraîne pas l'apparition de tumeurs nouvelles. La virulence de la souche utilisée est démontrée par inoculation sur plantes saines.

Mais nombre d'auteurs ne se sont pas contentés de constater une vaccination en quelque sorte naturelle. Ils sont parvenus à la réaliser expérimentalement.

La technique employée en vaccinothérapie végétale varie suivant l'agent infectieux contre lequel on veut prémunir la plante et suivant les plantes sur lesquelles on opère. Comme vaccin, les auteurs utilisent tantôt une souche naturellement peu virulente de l'espèce pathogène, tantôt des germes de virulence atténuée ou complètement détruite par des agents physiques ou chimiques, tantôt encore un filtrat ou un extrait de culture; quelques-uns se servent d'un extrait de plante infectée.

Si l'expérimentateur a en vue le traitement d'un nombre restreint de plantes, il inocule directement celles-ci au moyen d'une seringue munie d'aiguille ou par application locale (à l'aide, par exemple, d'un tampon d'ouate imbibé de vaccin); ou bien, il cultive le Végétal dans le liquide vaccinant. Lorsqu'il s'agit d'une vaccination en masse (ce qui est le cas le plus courant en agriculture, en horticulture, etc.), on arrose le terrain en culture avec un vaccin liquide ou on l'ensemence avec la souche vaccinante.

Ces divers procédés tendent, en définitive, à obtenir une absorption aussi parfaite que possible par le Végétal du matériel immunisant.

Les premiers essais de vaccination, effectués d'ailleurs avec succès, ont été publiés en 1901 par BEAUVERIE et RAY.

J. RAY inoculait à des plantes ordinairement attaquées par *B. putrefaciens* des cultures de ce germe soumises au

préalable à l'action de la chaleur; la lésion légère qui en résultait étant disparue, la culture vivante de *B. putrefaciens* alors inoculée ne déterminait aucun symptôme de maladie.

BEAUVÉRIE avait découvert que la maladie de la « Toile » qui affecte le Bégonia est due à une forme filamenteuse et stérile de *Botrytis cinerea*. En cultivant des boutures de Bégonia sur une terreensemencée avec une forme non pathogène du Champignon, le savant lyonnais obtint des plantes insensibles à la forme « Toile » pathogène.

Depuis la brillante réussite de BEAUVÉRIE, la vaccination contre la maladie de la « Toile » a fait l'objet des travaux de plusieurs auteurs: NOBÉCOURT (1928), CARBONE et JARACH (1931), CARBONE et Mlle ARATA (1935), etc. Elle est même devenue un cas tellement classique qu'elle sert maintenant moins à démontrer la possibilité d'une vaccination des Végétaux qu'à en étudier le mécanisme.

NOBÉCOURT réussit également à immuniser des Fèves contre une Bactérie, *B. carotovorus* qui se développe avec rapidité dans les tissus végétaux en les désorganisant complètement. Des pieds de Fèves sont inoculés avec un filtrat de culture de *B. carotovorus*, qui ne les affecte pas sensiblement. L'inoculation, 15 jours après, d'une culture jeune et virulente à ces mêmes plants ne détermine que des lésions peu graves, tandis que les plants témoins meurent en 36 à 48 heures.

L'Ecole italienne a consacré à l'immunité végétale acquise une notable part de ses travaux. Nous avons déjà vu les résultats obtenus par CARBONE et Mlle ARATA.

Mlle ZOJA (1924), en faisant germer du Blé dans un extrait aqueux de culture d'*Helminthosporium*, obtient un plant de Blé qui apparaît immunisé, au moins pour un certain temps, contre ce parasite.

PASSALACQUA (1934) aurait fait acquérir à *Pelargonium zonale* (par un procédé de vaccination) une certaine immunité vis-à-vis d'une Bactérie isolée de cette plante et qui provoque la chlorose de ses feuilles.

Mais les résultats les plus nombreux sont dus au savant

ARNAUDI qui a réussi au moyen de différentes techniques à vacciner plusieurs espèces de plantes. Des tubercules de Pomme de terre normalement infectés par une souche phytopathogène de *B. mesentericus* sont trempés dans des cultures de ce germe atténuées par vieillissement ou addition d'acide lactique au milieu de culture. Les tubercules ainsi traités sont ensuite très peu affectés par une souche virulente de *B. mesentericus* (1925).

ARNAUDI immunise également *Pisum sativum* contre *Blepharospora cambivora* (1928), ainsi que le Tabac contre *Thielaviopsis basicola* (1933). Il vaccine le Tabac au moyen de suspensions ou de cultures du Champignon tuées, qu'il incorpore à la terre où doivent germer les graines. Dans ces conditions, les plantules, après avoir subi une intoxication légère, croissent normalement et un essai de réinfection avec la culture jeune de *Thielaviopsis* les montre résistantes.

Une vaccination contre *Bact. tumefaciens* est réalisée par ARNAUDI, grâce à une ingénieuse technique. Un rameau sain de *Geranium* est relié par un tube de verre rempli d'eau à un plant de *Geranium* atteint de tumeurs ; il y a ainsi échange des liquides nutritifs et des sucs cellulaires entre les deux organismes. On constate que le rameau sain devient par ce traitement insensible à l'action tuméfiante de *Bact. tumefaciens*.

Les essais de GHEORGHIU font faire un progrès à la question de l'immunisation végétale en montrant que la vaccination peut non seulement prémunir une plante contre une affection, mais l'en guérir. En premier lieu, il vaccine préventivement des plants de *Pelargonium zonale* en leur inoculant un vaccin constitué par des cultures jeunes de *Bact. tumefaciens*, chauffées à 60° C.

Le même vaccin est utilisé pour un traitement curatif : son inoculation à des plantes malades entraîne la dessiccation puis la disparition totale des tumeurs.

Signalons enfin une très importante expérience d'ARNAUDI, qui démontre la possibilité d'une immunisation passive des plantes par l'emploi de sérums convenables.

ARNAUDI utilise du sérum de Lapin préparé qui agglutine *Bact. tumefaciens* à la dilution limite de 1/50.000. Deux rameaux de *Geranium* porteurs de tumeurs, séjournant dans de l'eau additionnée de ce sérum, montrent la régression et la dessiccation rapide de ces tumeurs.

On ne peut nier, en définitive, que la vaccinothérapie et même la sérothérapie ne soient appelées à rendre de grands services en pathologie végétale.

Mais pour en obtenir le maximum de bénéfice, il faudrait posséder sur cette question des données plus complètes. Quel est le temps nécessaire pour conférer l'immunité au Végétal? Quelle est la durée de l'état d'immunité obtenu? A-t-il une réelle spécificité? Problèmes que les travaux publiés jusqu'ici ne résolvent pas encore.

D'autre part, le mécanisme de l'immunisation végétale active ou passive est loin d'être élucidé. Aussi plusieurs savants, de l'Ecole italienne, en particulier, s'efforcent-ils actuellement de le préciser.

LEEMANN (1931) dénie une réelle spécificité à l'immunité conférée aux plantes. Cet auteur est, en effet, arrivé à augmenter ou à diminuer la sensibilité d'une plante vis-à-vis d'un Champignon en ajoutant simplement au sol sur lequel elle était cultivée des extraits ou sécrétions de microorganismes divers ou même des substances organiques quelconques. Ces substances ainsi utilisées produiraient, selon LEEMANN, des modifications de composition des sucs de la plante, de sorte que celle-ci ne serait plus étroitement adaptée au parasite.

Nous pensons que cette explication, valable peut-être pour les essais de LEEMANN, est loin d'être généralisable.

NOBÉCOURT estime que, dans le cas de l'immunité acquise par le Haricot contre la Toile, « la seule hypothèse admissible... est celle de la production par la plante, d'antitoxines annihilant l'effet des sécrétions nécosantes du Champignon ».

CARBONE et Mlle ARATA considèrent que l'immunité acquise par le Haricot vacciné contre la Toile « appartient au type des immunités par hypersensibilité hyperréactive », et

ces auteurs pensent qu'il y a peut-être production de substances microbicides par les cellules de la barrière de défense.

Tout récemment (1935), Mlle ARATA a étudié de façon approfondie les réaction histologiques et cytologiques des plantes vaccinées.

Elle a constaté que, chez les plantes vaccinées, le mycélium du champignon infestant est beaucoup moins vigoureux, plus grêle que chez les plantes non vaccinées.

Mlle ARATA en conclut que « *l'immunité acquise des plantes n'est pas due simplement au facteur histo-cytologique.* »

Nous verrons au chapitre suivant si les résultats obtenus jusqu'à présent dans la recherche d'anticorps normaux et spécifiques chez les Végétaux apportent la preuve de l'existence chez ceux-ci d'un facteur humoral.

CHAPITRE III

Les anticorps chez les Végétaux

I. — Anticorps normaux

L'étude de l'immunité animale a montré, qu'à côté d'anticorps provoqués par l'introduction dans l'organisme d'un antigène donné, il existe des anticorps qui s'observent chez les Animaux n'ayant été soumis à aucune infection, ni aucune préparation. Ce sont les anticorps normaux. Il semble donc logique de tenir compte de cette catégorie d'anticorps chez les Végétaux. Mais leur recherche, déjà difficile dans les sérums, est singulièrement plus compliquée lorsqu'on expérimente sur les sucres végétaux où des substances diverses « *provoquent des phénomènes tout à fait analogues, du moins en apparence, aux phénomènes si caractéristiques des anticorps observés chez les Animaux* » (CARBONE et ARNAUDI, 1930).

Nous allons, par conséquent, envisager chez les plantes non « préparées » les différentes propriétés agglutinantes, précipitantes, sensibilisantes, antitoxiques. Nous verrons ensuite s'il y a lieu de rapporter certaines d'entre elles à de véritables anticorps normaux.

1) PROPRIÉTÉS AGGLUTINANTES OU LYSANTES

A L'ÉGARD DES HÉMATIES

Signalons tout d'abord le comportement de divers sucres végétaux vis-à-vis des hématies. KOBERT (1902), KRAUS

(1902), LANDSTEINER et RAUBITSCHKE (1907), EISLER et PORTHEIM (1909, 1911, 1912, 1926), SCHNEIDER (1912), ont, observé l'agglutination des globules rouges par différents alcaloïdes ou glucosides, par les extraits de graines de plusieurs Légumineuses, les extraits de graines et le latex d'Euphorbes, etc. Le suc de Pomme de terre possède aussi une action hémagglutinante qui a été notée par CARBONE (1920), VIGLIANO (1922), MARCUSSE - BEGUN (1925). D'ailleurs, dans les recherches de VIGLIANO qui ont porté sur un nombre considérable de plantes, toutes les espèces expérimentées sont douées de pouvoir hémagglutinant.

Plusieurs auteurs ont essayé d'isoler la substance agglutinante et d'en préciser les propriétés. Elle semble agir jusqu'à des dilutions assez élevées: 1/32.000 (LANDSTEINER et RAUBITSCHKE), 1/50.000 (MARCUSSE - BEGUN), 1/200.000 même chez *Phaseolus vulgaris* (PEETERS, 1932).

La substance agglutinante est, en général, peu sensible à l'action de la chaleur. Suivant PEETERS, elle résiste à un chauffage à 80°; à un chauffage de 10 minutes à 96°, d'après EISLER et PORTHEIM. Elle est détruite à 100° dans les expériences de LANDSTEINER et RAUBITSCHKE, de MARCUSSE-BEGUN et PEETERS, mais VIGLIANO constate encore son action après ébullition.

L'« hémagglutinine » aurait un support protéique selon LANDSTEINER et RAUBITSCHKE : ces auteurs trouvent qu'elle est précipitable par l'alcool, le sulfate d'ammoniaque et difficilement dialysable. EISLER et PORTHEIM pensent plutôt qu'elle n'est pas une albumine proprement dite, mais « une combinaison d'azote inférieure, stade intermédiaire de la formation des albumines ».

PEETERS, qui a étudié de façon systématique l'hémagglutination par l'extrait de *Phaseolus vulgaris*, expose des résultats qui cadrent exactement avec les faits connus pour l'agglutination sérique: 1° l'agglutination n'a lieu qu'en présence d'électrolytes; 2° les globules de Bœuf, qui ne sont

pas agglutinés, fixent néanmoins l'agglutinine et en dépouillent l'extrait de *Phaseolus* ⁽¹⁾.

La plupart des auteurs qui ont noté l'agglutination des globules rouges du sang par les sucs végétaux ont également observé chez ceux-ci un pouvoir hémolytique et un pouvoir antihémolytique (KOBERT, 1902; EISLER et PORTHEIM, 1909; WILENKO, 1910; VIGLIANO, 1922; CARBONE, 1920-1922-1930; CARBONE et ARNAUDI, 1924-1925; ARNAUDI, 1925).

Les principes hémolytique et antihémolytique de VIGLIANO ne sont pas détruits même à l'ébullition. Par contre, l'action hémolytique du suc de Pomme de terre, étudiée par CARBONE, disparaît après chauffage de 5 minutes à l'ébullition mais réapparaît si on additionne le suc ainsi chauffé de sérum frais de Cobaye. L'hémolysine de la sève du Mûrier (ARNAUDI) même non chauffée n'agit sur les globules de Mouton qu'en présence d'alexine. Les observations de CARBONE et ARNAUDI sembleraient prouver que certaines plantes élaborent une sorte de sensibilisatrice.

2) PROPRIÉTÉS PRÉCIPITANTES

A L'ÉGARD DES SÉRUMS ET DES EXTRAITS VÉGÉTAUX

Les produits d'origine végétale, composants des sucs ou sucs entiers sont également doués souvent de pouvoir précipitant vis-à-vis des sérums animaux. La précipitation de divers sérums a été observée par KRAUS (1902) avec la ricine, par LANDSTEINER et RAUBITSCHKE (1907), SCHNEIDER (1912) avec l'extrait de *Phaseolus*, par WILENKO (1910) avec la ricine, l'abrine, la protéine de *Phaseolus*, de blé, d'avoine, etc., par KRITCHEWSKY (1914) avec l'extrait de *Cotyledo*, par VIGLIANO (1922) avec le suc de Citron, d'*Opuntia*, etc.

(1) La fixation de l'agglutinine est la partie spécifique du phénomène, la précipitation qui s'ensuit pouvant être empêchée. On sait, du reste, que le sérum de Bœuf renferme souvent des substances stabilisantes: la suspension de globules utilisée en contenait peut-être des traces.

Les recherches de KOSTOFF (1928-1931) fournissent des résultats non plus sur la précipitation de protéines animales par les sucs végétaux, mais sur la précipitation de ces sucs entre eux. L'extrait d'une plante de la famille des Solanacées, par exemple, donne un précipité très net en présence de l'extrait d'une autre espèce de la même famille. CHESTER et WHITAKER (1932-1933) qui se sont efforcés de préciser la nature des réactions observées pour la première fois par KOSTOFF, trouvent qu'un grand nombre de celles-ci se rapportent à une simple réaction chimique qui fournit un précipité d'oxalate de calcium. Les précipitations entre sucs végétaux qui ne rentrent pas dans ce cadre se classeraient, suivant les auteurs, en trois catégories: 1° réactions entre substances de poids moléculaire élevé, mais non protéiques; 2° réactions entre substance protéique et substance non protéique; 3° réactions difficilement analysables.

Quelles conclusions générales tirer de l'ensemble de ces faits ?

On sait que les anticorps animaux ont un support de nature protéique, qui implique un certain nombre de propriétés. Notons seulement qu'ils sont détruits aux températures élevées, sont retenus par les parois de certains filtres, précipitent par le sulfate d'ammoniaque, sont détruits par des ferments (pepsine, trypsine), n'agissent qu'en présence d'une quantité minimum d'électrolytes et jusqu'à des dilutions assez élevées.

Dans les travaux analysés précédemment, les « anticorps » végétaux sont le plus souvent très résistants à l'action destructive de la chaleur, mais on sait que les protéines végétales y sont moins sensibles que les protéines animales.

En ce qui concerne les « hémagglutinines » normales, le fait le plus constant est la dilution élevée à laquelle elles sont encore actives, mais ceci est évidemment insuffisant pour nous permettre de leur donner le nom d'anticorps. Seule l'agglutinine que PEETERS a isolée de *Phaseolus*, apparaît douée de propriétés intéressantes et qui demanderaient une vérification.

Quant aux principes hémolytique et antihémolytique, leur étude quoique poursuivie par de nombreux chercheurs, reste encore très incomplète; les résultats manquent de précision et sont souvent contradictoires. CARBONE et ARNAUDI jugent prudent de les considérer comme des « *pseudo-anticorps* », réserve faite d'une étude ultérieure plus systématique.

3) PROPRIÉTÉS ANTITOXIQUES A L'ÉGARD DES SÉCRÉTIONS FONGIQUES

Des expériences un peu différentes ont été poursuivies par NOBÉCOURT (1928), concernant la présence possible dans les sucS végétaux de substances neutralisant les sécrétions toxiques fongiques. Cet auteur étudie l'action des sucS d'*Opuntia*, de Fève, de Navet, de Carotte, de Laitue, de Tomate vis-à-vis de *Sclerotinia Libertiana*, *Botrytis*, *Mucor* etc. Les résultats obtenus montrent que les plantes expérimentées possèdent la propriété d'affaiblir l'action toxique des Champignons à l'infestation desquels elles sont réfractaires. Les sucS de ces mêmes espèces végétales sont sans action sur les toxines des Champignons pathogènes pour elles. Il existerait donc un rapport entre l'immunité des plantes et leur pouvoir antitoxique à l'égard des Champignons phytopathogènes. Quant aux propriétés de ces antitoxines, l'auteur en précise une seule: leur résistance (sauf dans un cas) aux températures élevées.

4) PROPRIÉTÉS AGGLUTINANTES A L'ÉGARD DES BACTÉRIES OU PRÉCIPITANTES A L'ÉGARD DES EXTRAITS BACTÉRIENS

Voyons maintenant si les recherches d'anticorps normaux agissant vis-à-vis des Bactéries fournissent des résultats plus précis.

Miss BERRIDGE (1929), parvient à agglutiner différentes Bactéries avec le suc de Pomme de terre. Elle trouve que le pouvoir agglutinant de ce suc varie dans le même sens que

son pH. Pour cet auteur, la propriété agglutinante du suc de Pomme de terre serait due aux traces de sels métalliques bi ou trivalents qu'il renferme: elle ne peut être considérée comme une propriété anticorps. Cependant, elle semble jouer un rôle de défense, car, dans les essais de Miss BERRIDGE, les Bactéries qui infectent ordinairement la Pomme de terre ne sont pas agglutinées par son suc, tandis que le sont nettement les espèces dénuées pour elle de pouvoir pathogène. Ce fait n'est pas invraisemblable: ce serait un cas d'immunité chimique, immunité dont il a été parlé précédemment.

VIGLIANO qui avait déjà observé que le suc d'un grand nombre de Végétaux agglutine les globules rouges, agglutine aussi les Bactéries avec *Opuntia*, *Stachys*, *Daucus carota*, Chou, Epinard, Céleri, Citron, etc. (1922). Avec ce fruit l'agglutination est très probablement due à la grande acidité de son suc.

Mais plusieurs auteurs ont étudié des cas d'agglutination et de précipitation dont le mécanisme n'apparaît pas aussi simple.

KRITCHEWSKY (1914) extrait par pression le suc de *Cotyledo Scheideckeri*. Ce suc, soumis à la centrifugation, puis dilué dans l'eau physiologique, agglutine les Bacilles typhique et tuberculeux et le Vibrion cholérique. Il précipite également les extraits de ces Bactéries. La dilution limite d'agglutination atteint dans certains cas 1/450, la dilution limite de précipitation 1/150 à 1/200. Il y a, en général pour une même plante, parallélisme entre la teneur en agglutinine et la teneur en précipitine.

Quelques-unes des propriétés attribuées par KRITCHEWSKY au suc de *Cotyledo* seraient analogues à celles qu'on reconnaît aux sérums agglutinants. En effet, avec le temps, le suc perd une partie de son pouvoir agglutinant et précipitant. Ce pouvoir disparaît complètement par filtration du liquide sur bougie Chamberland L 5. D'autre part, mis en présence de germes, puis centrifugé, le suc n'agglutine plus; la substance active aurait donc été fixée par l'antigène. Mais ces

propriétés sont en contradiction avec les faits suivants: l'agglutinine résiste à une température très élevée: 134° et à l'action de la pepsine et de la trypsine, ce qui n'a rien de surprenant puisque le suc de *Cotyledo* ne donne pas les réactions de l'albumine.

Constatant l'agglutination des Bactéries par l'extrait aqueux de feuille de Laurier-Cerise et la sève élaborée du Mûrier, CARBONE et ARNAUDI songent à établir une relation entre ce phénomène et le pH plus ou moins élevé des liquides actifs. Mais l'expérience montre aux savants italiens qu'il n'existe aucun parallélisme entre l'intensité du pouvoir agglutinant de ces sucs végétaux et leur acidité. De plus les liquides filtrés sur bougie Chamberland F. ou bien soumis durant quelques minutes à l'ébullition directe ont perdu toute propriété agglutinante sans que leur pH ait été en rien modifié.

WAGNER (1915) accorde, comme Miss BERRIDGE, une valeur immunitaire aux propriétés agglutinantes et bactéricides de *Solanum tuberosum*, mais semble de plus les attribuer à de véritables anticorps.

Les recherches de cet auteur sont effectuées sur le suc de tubercules de *Solanum* et le suc de *Sempervivum Hausmanii*. Ces sucs sont obtenus par pression, filtrés et employés immédiatement ou conservés dans le vide. Une anse de chacun de ces sucs est mise en présence de 1/100 d'anse de culture de *B. mesentericus vulgatus*, *Bact. putidum*, *B. asteroporus* (1). Les plastides des trois espèces sont d'abord nettement agglutinées, puis plus ou moins lysées.

Afin d'étudier la nature de la substance active, WAGNER additionne le suc de sulfate d'ammoniaque. Il sépare ainsi d'un liquide qui est dépourvu de propriétés bactéricides, un précipité qui apparaît comme étant le support du principe bactéricide. L'anticorps ainsi isolé est thermolabile: il est détruit par chauffage de 15 minutes à 60° C. ou de 2 heures

(1) Ces trois espèces bactériennes sont pathogènes pour *Solanum*, les deux premières seulement pour *Sempervivum*.

à 45° C. Une action assez prolongée de la lumière du jour parvient aussi à faire disparaître son activité.

Selon WAGNER, les plantes expérimentées contiendraient donc normalement des substances antibactériennes: agglutinines, lysines, qui seraient la résultante de processus biologiques et mettraient la plante en mesure de se défendre contre différentes Bactéries. Ces substances auraient une nature anticorps.

Cette dernière conclusion semble aussi être celle de VISCO dans ses recherches sur l'agglutinine normale du Citron. Nous reparlerons plus longuement de ce travail.

Les conclusions que nous avons données à propos des principes végétaux hémagglutinants, hémolytiques et antihémolytiques sont aussi celles qui se dégagent de la plupart des travaux qui viennent d'être exposés. Les données fournies jusqu'à présent sur les substances antibactériennes normales des plantes sont souvent contradictoires, trop peu nombreuses pour que l'on puisse établir avec certitude la nature de ces substances. On pourrait objecter cependant que l'ensemble des résultats acquis par WAGNER plaide en faveur de la « nature anticorps » des agglutinines et lysines de *Solanum* et *Sempervivum*. Malheureusement, les conditions expérimentales de l'auteur nous obligent à formuler des réserves sur ses conclusions.

De façon générale, les propriétés agglutinantes, précipitantes ou lysantes du suc de plantes saines, décrites dans la littérature, ne sont pas dues à des anticorps mais à des substances que CARBONE appelle des « *pseudo-anticorps* ». Le savant italien a fort bien mis en garde les chercheurs contre la cause d'erreur que constituent ces substances et le terme de « *pseudo-anticorps* » proposé pour les désigner est d'un emploi commode qui tend à se généraliser dans la littérature. Mais il ne faut pas perdre de vue que « *le groupe des pseudo-anticorps est, en réalité, quelque chose d'artificiel* ». On peut y faire entrer les substances les plus diverses, soit de composition chimique déterminée (acides, glucosides, alcaloïdes, tanins), soit de nature complexe

(protéique, par exemple) et, en général, toute substance qui, par un mécanisme quelconque, provoque des réactions analogues aux réactions anticorps.

II. — Anticorps apparaissant chez les Végétaux à la suite de l'infection naturelle ou de l'inoculation expérimentale

Nous venons de voir que les suc de plantes non préparées sont capables d'agglutiner ou de lyser globules rouges et Bactéries.

Examinons maintenant les résultats obtenus par les auteurs qui ont essayé de déceler dans l'organisme végétal des anticorps élaborés soit à la suite d'une infection spontanée ou provoquée, soit à la suite d'injection d'un antigène quelconque.

1) FORMATION D'ANTICORPS DANS LES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES

On sait que les associations entre plante et parasite, désignées sous le nom de « symbioses » sont des cas de maladie où les moyens de défense de la plante sont assez puissants pour lui permettre, sinon d'expulser les microorganismes envahisseurs, du moins de les héberger sans en souffrir profondément.

Nous avons montré comment la symbiose Orchidée-*Rhizoctonia* a permis à Noël BERNARD de découvrir parmi les processus immunitaires de l'Orchidée envahie des figures de phagocytose. Ce mécanisme de défense étant démontré, on pouvait aussi avec quelque raison supposer l'existence de réactions humorales et chercher à les mettre en évidence.

En effet, Noël BERNARD a très bien observé que la phagocytose du Champignon est précédée d'un pelotonnement très net des filaments mycéliens. Ce pelotonnement lui apparaissait comparable à l'agglutination des Bactéries par les sérums, et lui semblait dû à une « propriété agglutinative

de la sève intracellulaire ». Malheureusement une mort prématurée n'a pas permis à Noël BERNARD de donner la preuve de cette hypothèse.

En revanche, il est parvenu à démontrer *in vitro* l'existence dans les bulbes d'Ophrydées de substances à propriétés fungicides vis-à-vis de *Rhizoctonia*. Son expérience était ainsi réalisée: il déposait un fragment de bulbe de *Loroglossum* sur gélose inclinée et ensemençait en même temps à une certaine distance *Rhizoctonia repens*. Le Champignon se développait d'abord normalement, puis sa croissance s'arrêtait brusquement suivant une ligne très nette à un ou deux centimètres du fragment de bulbe.

Noël BERNARD conclut de ce fait à la présence dans le bulbe d'Orchidée d'une substance fungicide qui diffuse dans la gélose jusqu'à une certaine distance. Il trouve que cette substance est encore active, même fortement diluée. Elle est détruite par chauffage à 55° C. pendant 35 minutes et semble douée d'une certaine spécificité.

Cette découverte a été confirmée par NOBÉCOURT (1923 et 1928) et par J. MAGROU (1924) qui ont longuement répété les essais de Noël BERNARD en faisant varier les conditions d'expérience.

Noël BERNARD semblait admettre que la substance pré-existe dans le bulbe à l'attaque du Champignon. Pour NOBÉCOURT, au contraire, elle est le produit de réaction développé sous l'influence des toxines sécrétées par le Champignon, toxines qui dans l'expérience *in vitro* diffusent dans la gélose. N. BERNARD pensait que la disparition par chauffage de la résistance chez les tubercules d'Ophrydées est due à la destruction de la substance microbicide. Mais NOBÉCOURT constate que les bulbes gelés sont envahis par le Champignon aussi bien que les bulbes chauffés, et il estime qu'une substance ne peut être à la fois thermolabile et cryolabile. D'autre part, en étudiant l'action du chloroforme, il constate les faits suivants: 1° un bulbe chloroformé ne s'oppose pas au développement du mycélium; 2° si l'on fait séjourner un bulbe un certain temps sur gélose, en présence du Champignon, pour le soumettre ensuite

seulement à l'action du chloroforme, on observe que ce bulbe possède encore la propriété d'inhiber la croissance du mycélium. Le chloroforme n'a donc pas détruit la substance microbicide que le bulbe avait élaborée en présence du Champignon. La conclusion de NOBÉCOURT est la suivante: chez les bulbes neufs, c'est-à-dire n'ayant pas été au contact de Champignons, la perte de résistance sous l'influence d'un agent physique ou chimique est due à la mort des cellules devenues ainsi incapables de réagir. NOBÉCOURT trouve là une preuve convaincante de son hypothèse: la substance fungicide n'apparaît que sous l'influence du Champignon; elle « *mérite donc, à proprement parler, le nom d'anticorps* ».

MAGROU est pourtant d'un avis opposé. Voici l'expérience essentielle sur laquelle il s'appuie: un fragment aseptique de tubercule est déposé sur gélose et y séjourne deux semaines. Le fragment étant alors retiré, on ensemence dans le même tube un Champignon: *Rhizoctonia repens*. Celui-ci ne se développe que de manière insignifiante. La gélose renferme donc la substance fungicide élaborée par le tubercule, en l'absence de Champignon. Cette substance existe normalement dans le tubercule d'Orchidée. On connaît la valeur de ces savants et les deux conceptions sont fondées, de part et d'autre, sur des expériences très bien conduites et qui sembleraient démonstratives.

La contradiction qu'elles présentent tient peut-être aux différences de comportement qui existent entre les individus d'une même espèce en ce qui concerne la production d'anticorps: telle est d'ailleurs la conclusion de NOBÉCOURT.

Remarquons enfin que, même au cas où le pouvoir inhibiteur des tubercules d'Orchidées serait une propriété normale de celles-ci, il serait assez légitime de le considérer comme acquis au cours de nombreuses générations d'Orchidées dont les racines vivent en symbiose avec les *Rhizoctonia* et, par conséquent, comme un véritable anticorps.

Si la symbiose des Orchidées a permis d'émettre l'hypo-

thèse d'une agglutinine et de démontrer l'existence d'une substance fungicide, les Légumineuses devaient offrir un sujet de recherches du même ordre.

On considère, en effet, que les plantes de cette famille vivent en symbiose avec une Bactérie: *B. radiculicola* qu'elles hébergent à l'intérieur d'hypertrophies ou nodosités de leurs racines. Elles seraient donc en mesure de se défendre par des processus divers.

A l'intérieur des nodosités des Légumineuses, *B. radiculicola* se présente en formes anormales, ramifiées ou arrondies, désignées sous le nom de « bactéroïdes ». Cette transformation de la Bactérie serait une conséquence des réactions défensives de la plante.

NEMEC a observé également le fait suivant (décrit par KORINEK, 1924) : au moment de la digestion de *B. radiculicola* par les cellules-hôtes, les germes qui sont habituellement dispersés de façon régulière, forment des groupes qui rappellent assez bien les amas dus à l'agglutination sérique. Mais KORINEK reconnaît que ce phénomène ne présente peut être qu'une simple analogie d'aspect avec l'agglutination et que pour en connaître la nature il faut recourir à l'expérimentation *in vitro*.

D'après HILTNER et STÖRMER (1903), le suc des Légumineuses serait capable de déterminer, *in vitro*, la lyse et la désintégration de *B. radiculicola*.

Par contre, les essais d'agglutination de *B. radiculicola* effectués par KORINEK (1924) sur le suc de plusieurs espèces de Légumineuses ont abouti à des résultats complètement négatifs, aussi bien avec le suc des racines qu'avec celui des tiges qui, non envahies, auraient pu renfermer des anticorps normaux.

Pourtant l'hypothèse d'anticorps chez les Légumineuses n'était pas définitivement infirmée par cet échec, car, vers la même époque, CAPPELLETTI reconnaissait chez les Légumineuses une agglutinine active *in vitro*, et parvenait, au cours de plusieurs années de recherches, (1923-1928) à en préciser les propriétés et les conditions de formation.

Dans les expériences de CAPPELLETTI, le suc obtenu par pression des nodosités de Légumineuses agglutine *B. radicola* jusqu'à la dilution de 1/240. Cette propriété disparaît par chauffage du suc à 78°-80° C. pendant une demi-heure.

Pour l'auteur, la substance agglutinante serait bien la conséquence d'un processus biologique de défense, car il existe un parallélisme marqué entre les trois phénomènes suivants: 1° présence d'agglutinine dans les racines; 2° activité particulière des cellules infectées (cellules dont le noyau s'hypertrophie); 3° transformation des Bacilles en bactéroïdes à l'intérieur de ces cellules. Plusieurs espèces de Légumineuses, parmi lesquelles *Lathyrus* présentent, en effet, ces trois sortes de phénomènes; au contraire, chez d'autres espèces, *Phaseolus*, par exemple, le noyau des cellules ne s'hypertrophie pas, on ne rencontre pas de formes bactéroïdes, et il est également impossible de démontrer *in vitro* une action agglutinante de leur suc. Un autre fait rend compte aussi de ce parallélisme: les Légumineuses ne renferment des anticorps qu'au moment de la floraison et c'est aussi pendant cette période seulement qu'on peut y observer des bactéroïdes.

Est-il permis de conclure avec l'auteur que l'agglutination *in vitro* de *B. radicola* par le suc des nodosités de Légumineuses est due à une véritable agglutinine?

La présence simultanée d'agglutinine et de formes bactéroïdes n'en est pas une preuve absolument démonstrative. ZIPFEL (1911), BARTHEL (1921) ont montré, en effet, qu'on peut provoquer la transformation en bactéroïdes de *B. radicola* au moyen d'alkaloïdes, la caféine, par exemple; or, selon ces auteurs, les racines de Légumineuses contiendraient toujours des alkaloïdes.

Remarquons aussi que CAPPELLETTI n'a pas réussi à démontrer de façon rigoureuse la spécificité de la réaction d'agglutination étudiée par lui.

Cependant, la relation constante qui existe entre l'activité cytologique des racines infectées et l'action aggluti-

nante de leur suc est nettement favorable à l'hypothèse de l'élaboration par les Légumineuses d'une substance de défense. Cette substance est-elle un véritable anticorps? La dilution assez élevée à laquelle elle agit encore, sa thermolabilité tendraient à le prouver.

2) FORMATION D'ANTICORPS

DANS LES AFFECTIONS SPONTANÉES OU EXPÉRIMENTALES

D'après les résultats précédemment exposés, et malgré la contradiction que présentent quelques-uns d'entre eux, on peut admettre que les plantes vivant en symbiose sont capables d'élaborer des anticorps spécifiques. Mais, si ces plantes offrent une résistance particulière au parasite, celles pour qui l'agent infectieux est pathogène ne se laissent pas non plus envahir sans réagir. Aussi, plusieurs auteurs ont-ils pensé pouvoir trouver des anticorps dans les organismes végétaux atteints d'une affection spontanée ou expérimentale.

En 1906, alors qu'on portait encore généralement toute son attention sur les facteurs chimiques de résistance des plantes à l'infection, SCHIFF-GIORGINI reconnaissait des réactions humorales chez l'Olivier attaqué par *B. oleae* qui provoque sur cet arbre des formations pathologiques désignées sous le nom de tubercules.

Dans une première série d'essais, l'auteur prélève des fragments d'écorce, de bois, de moëlle, d'une part sur les plantes saines, d'autre part sur les plantes malades, et ceci dans les régions avoisinant les tubercules. Il immerge ces fragments dans des cultures jeunes de *B. oleae* en bouillon. Après 40 heures, il observe une sorte d'agglutination des plastides bactériennes dans les cultures contenant des fragments de plantes malades, tandis que les cultures additionnées de fragments de plantes saines conservent un trouble uniforme.

Pour une deuxième série d'expériences, SCHIFF-GIORGINI utilise l'extrait aqueux d'écorce. Cet extrait se révèle doué d'un pouvoir agglutinant plus élevé que les fragments d'écorce. En effet, les cultures additionnées d'extrait d'écorce de

plant malade montrent après 18 heures des Bactéries réunies en amas, mal colorables et souvent réduites à l'état de grains: l'agglutination serait donc suivie de bactériolyse.

L'auteur signale en outre un fait important: l'absence de pouvoir agglutinant et bactéricide chez l'extrait qui a été soumis à une courte ébullition.

Il nous semble cependant que les conditions d'expérience de SCHIFF-GIORGINI comportent trop de causes d'erreur pour que les résultats qu'il a obtenus soient incontestables.

Ayant démontré la présence d'anticorps normaux ou « pseudo-anticorps » chez plusieurs espèces végétales, CARBONE (1920) a cherché à mettre en évidence dans le suc de Pomme de terre des agglutinines spécifiques. (On a vu que plusieurs auteurs y avaient décelé des anticorps normaux.)

CARBONE inoculait à des tubercules de Pommes de terre: 1° une souche de *B. asterosporus* peu virulente; 2° une souche de *B. atterimus* qui provoque en 7 jours une sorte de gangrène du tubercule. Le suc de ces tubercules, recueilli par pression 7 à 15 jours après l'inoculation et dilué de 1/2 à 1/50, n'a montré aucune action agglutinante vis-à-vis des antigènes homologues.

Après CARBONE, SARDINA (1926) s'efforce aussi de démontrer la formation d'anticorps chez les tubercules de *Solanum tuberosum*. En outre, il fait porter de nombreux essais sur *Vicia Faba*, *Lycopersicum*, *Cucurbita*, et sur diverses espèces d'*Opuntia*. Le matériel bactérien inoculé est constitué par *Bact. tumefaciens*, *Bact. campestre* et par trois souches de Bactéries isolées de maladies de la Pomme de terre et qui provoquent également la pourriture des cladodes d'*Opuntia*. La technique d'inoculation varie suivant les essais: 1° les plantes reçoivent des Bactéries tuées; 2° elles sont inoculées avec des Bactéries vivantes; 3° les injections de Bactéries tuées sont suivies d'injections de Bactéries vivantes. Le suc des différentes plantes en expérience est extrait par pression à la presse hydraulique et centrifugé. Le suc de Pomme de terre est en outre filtré, mais la filtration pouvant retenir l'agglutinine possible, l'auteur institue une série témoin compor-

tant du suc non filtré. Les sucs sont dilués et la suspension effectuée dans une solution de chlorure de potassium dont la concentration varie avec la pression osmotique de chacun des sucs utilisés, ceci afin que la solution soit rigoureusement isotonique.

Malgré toutes les précautions prises, SARDINA n'observe dans aucun cas l'agglutination ou la précipitation des Bactéries et il en conclut que les plantes expérimentées n'ont élaboré ni agglutinine, ni précipitine.

On a vu que les plantes atteintes de « *crown-galls* » ou tumeurs dues à la présence de *Bact. tumefaciens* ont servi souvent de matériel d'expérience pour des essais de vaccination et de sérothérapie et que plusieurs auteurs ont été assez heureux pour réussir à immuniser des plantes contre cette Bactérie. Aussi les plantes sensibles à *Bact. tumefaciens* ont-elles paru être un matériel de choix pour la recherche d'anticorps acquis et spécifiques.

Pour de tels essais, KORINEK (1924) choisit *Beta vulgaris*, dont les racines inoculées avec une suspension de *Bact. tumefaciens* présentent au bout de trois mois d'énormes tumeurs. Puis il pratique l'agglutination avec le suc obtenu par pression des tumeurs et avec le suc provenant du reste de la racine. Les plastides sont mises en suspension et les sucs dilués dans l'eau physiologique et le phénomène est observé entre lame et lamelle. KORINEK constate une agglutination avec le suc des tumeurs. Mais plusieurs faits lui démontrent que cette agglutination n'a rien de spécifique: 1° elle est aussi intense avec une Bactérie hétérologue: *B. prodigiosus*; 2° le suc des parties saines de la racine agglutine aussi fortement *Bact. tumefaciens*; 3° le suc coagule spontanément. KORINEK admet que les plastides réunies en amas ont été soit entraînées par adsorption avec des parties coagulées du suc, soit attirées par une sorte de « chimiotactisme » vers des substances qui ont cristallisé entre lame et lamelle (1).

(1) Ce fait est à rapprocher des conclusions d'un travail récent de Ph. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR. Ces auteurs ont montré qu'on peut entraîner mécaniquement des plastides hétérologues dans l'agglutination sérique homologue. (Fasc. VII, trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, pp. 223-234, 1934.)

Nous avons vu précédemment que SARDINA n'avait trouvé ni agglutinines, ni précipitines spécifiques de *Bact. tumefaciens* chez plusieurs espèces végétales inoculées avec cette Bactérie.

RIKER (1926) n'a pas été plus heureux dans des essais effectués sur le suc de plants de Tomates porteurs de tumeurs.

Notons encore qu'ARNAUDI, GHEORGHIU, bien qu'ayant réussi à vacciner contre *Bact. tumefaciens*, le premier *Geranium*, le deuxième *Pelargonium*, n'ont pu déceler d'anticorps dans ces plantes après immunisation.

Malgré ces nombreux insuccès dans la recherche d'anticorps spécifiques de *Bact. tumefaciens*, J. MAGROU, qui consacre depuis longtemps une partie de sa belle activité scientifique à l'étude des tumeurs végétales s'est efforcé à son tour de mettre en évidence des réactions humorales chez les plantes atteintes de « crown-galls » (1935).

Le suc des tumeurs de Betterave n'a montré à MAGROU aucune action agglutinante ni précipitante (ce qui concorde avec les résultats de KORINEK). Mais *Pelargonium zonale* et *Chrysanthemum frutescens* lui ont permis de faire des observations fort intéressantes.

Donnons quelques détails sur son expérimentation et les résultats qu'elle apporte. Les recherches de MAGROU sont effectuées parallèlement avec trois sortes de sucS végétaux : 1° le suc des tumeurs; 2° le suc des parties saines de rameaux porteurs de tumeurs; 3° le suc de plantes saines. (Ces sucS sont obtenus à partir des deux espèces végétales déjà nommées.)

Le suc provenant des tumeurs de *Pelargonium* agglutine nettement *Bact. tumefaciens* jusqu'à une dilution de 1/1000 (dilution maxima essayée). Le suc des tumeurs de *Chrysanthemum* agglutine *Bact. tumefaciens* jusqu'à 1/10.000.

Ce pouvoir agglutinant paraît spécifique, car il ne se manifeste pas vis-à-vis de plusieurs Bactéries phytopathogènes expérimentées : *Bact. malvaceum*, *B. flaccumfaciens*, *B. mori*, *B. carotovorus*. Il y a plus: des deux souches de *Bact. tumefaciens* utilisés, celle qui est pathogène pour *Chrysan-*

themum est agglutinée par le suc de tumeurs de cette plante plus fortement et à des dilutions plus élevées que la souche non pathogène. Quant au suc de tumeurs de *Pelargonium*, il agglutine également les deux souches bactériennes qui sont toutes deux pathogènes pour *Pelargonium*.

Le suc de plantes saines, il est vrai, se montre aussi doué fréquemment de propriétés agglutinantes. Mais l'étude quantitative permet de différencier nettement l'agglutination produite par le suc de tumeurs de l'agglutination due au suc de plantes saines. Dans le premier cas, la courbe représentant l'intensité du phénomène en fonction de la concentration présente « *la forme d'un plateau horizontal suivi d'une ligne oblique descendante* ». Dans le deuxième cas, l'intensité de l'agglutination ne décroît pas de façon régulière avec la dilution, elle n'a lieu que dans une zone très limitée, de sorte qu'elle offre une courbe « *en clocher* ». Enfin, le suc de parties saines de rameaux porteurs de tumeurs donne une agglutination du même type que le suc de tumeurs elles-mêmes.

La réaction de précipitation met en évidence une différence encore plus marquée entre le suc de plante saine et le suc de plante malade. En effet, les extraits de *Bact. tumefaciens* sont précipités par le suc de tumeurs et par le suc des parties saines de rameaux malades provenant de *Chrysanthemum*, tandis qu'ils ne le sont aucunement par le suc de plantes saines.

Ces différences incontestables entre les propriétés des plantes saines et celles des plantes malades peuvent-elles être attribuées à une modification humorale, à la présence chez ces dernières d'un véritable anticorps? MAGROU ne se prononce pas encore. Il fait seulement remarquer que l'agglutination qu'il a observée n'est vraisemblablement pas due au tanin contenu dans les sucS étudiés, car des solutions de tanin (dont la concentration va de 1/500 à 1/20.000) se montrent dépourvues d'action agglutinante vis-à-vis de *Bact. tumefaciens*. Cette cause d'erreur n'est évidemment pas la seule qui puisse intervenir dans de telles réactions. Mais nous devons souligner que nous avons eu connaissance du travail de MAGROU par une note des Comptes rendus de l'Académie des

Sciences, note dont l'obligatoire concision a pu forcer l'auteur à passer sous silence les détails d'expériences dans lesquelles il éliminait les autres causes d'erreur possibles (la concentration en ions H^+ , par exemple).

MAGROU observe que la propriété agglutinante des sucres disparaît par chauffage à $100^{\circ} C.$ durant 15 minutes, mais ne précise pas, sans doute pour la raison que nous venons de signaler, s'il s'agit aussi bien de la propriété agglutinante des plantes saines que de celle des plantes malades. Il est vrai que si, seul, un anticorps élaboré par les plantes infectées était détruit aux températures élevées, l'agglutination normale n'en persisterait pas moins, après chauffage, dans le suc des tumeurs. Or, MAGROU ne dit rien de tel. Il est donc possible que l'action destructive du chauffage se fasse sentir sur le pouvoir agglutinant du suc des plantes saines, pouvoir agglutinant qui pourrait être dû à un véritable anticorps normal, de même nature qu'un anticorps immunitaire.

Malgré les précisions qui nous manquent, les résultats de MAGROU n'en apparaissent pas moins très importants. Nous espérons que l'éminent savant voudra bien donner un exposé plus complet de ses recherches, et nous serions heureux, connaissant la valeur de son expérimentation, qu'il nous fit connaître ses conclusions définitives.

3) FORMATION D'ANTICORPS

PAR INOCULATION DE BACTÉRIES NON PHYTOPATHOGÈNES

On sait que le pouvoir antigène d'une Bactérie n'est pas lié à sa virulence ou à son pouvoir toxigène et qu'un germe, considéré comme non pathogène pour un organisme donné, peut cependant provoquer chez cet organisme la production d'anticorps spécifiques. Ainsi, un Lapin inoculé avec *B. carryocyaneus* fournit un sérum qui agglutine cette Bactérie à la dilution de 1/100.000, dilution de l'ordre de celle qui s'observe dans l'agglutination du Bacille typhique par un sérum homologue (A. DUPAIX, 1933).

L'existence de ce fait a incité plusieurs auteurs à employer comme antigène vis-à-vis des Végétaux des Bactéries qui ne

déterminent chez ceux-ci aucun symptôme apparent de maladie. Malheureusement, la plupart ne sont pas parvenus à démontrer la présence d'anticorps chez les plantes ainsi préparées.

KORINEK (1924) n'a pu obtenir l'agglutination du Colibacille par le latex ou le suc d'Euphorbes soumises à des injections de *Bact. coli* qui n'avaient provoqué chez ces plantes aucun signe de nécrose.

CARBONE n'ayant pas observé d'agglutination par le suc de Pommes de terre, inoculées soit avec *B. asterosporus*, soit avec *B. atterimus*, pense que cet échec est peut-être dû à la rapidité des infections ainsi provoquées. C'est pourquoi il tente de nouvelles recherches avec *B. lactis albus*, germe qui n'est pathogène ni pour la Pomme de terre, ni pour le Lapin, mais qui n'en est pas moins un bon antigène, puisque le sérum de Lapin préparé avec *B. lactis albus*, l'agglutine jusqu'à 1/5.000.

Cependant, le suc extrait des tubercules, 9 jours ou 12 jours après la dernière inoculation, n'agglutine pas la Bactérie homologue.

En collaboration avec ARNAUDI, CARBONE (1924) recherche également des anticorps chez *Prunus laurocerasus* et *Morus alba* en employant comme antigène *B. atterimus* et trois germes non phytopathogènes mais très agglutinables : *Bact. typhi*, *Bact. coli* et *V. cholerae*.

Afin de déterminer quel est le liquide du Végétal (sève brute, sève élaborée ou suc de pression) convenable aux essais d'agglutination, susceptible de donner des résultats positifs et non erronés, CARBONE et ARNAUDI étudient dans des expériences préliminaires l'absorption de différentes substances par les plantes. A cet effet, ils utilisent des solutions d'éosine, de rouge neutre, d'hydrate de fer colloïdal et des sérums normaux ou immuns. L'examen microscopique des feuilles de Mûrier ayant absorbé de l'éosine montre que les tissus du bois sont fortement colorés en rouge. De plus, la sève du bois recueillie chez les plantes qui ont reçu du sérum normal donne la réaction du biuret; recueillie chez les plantes qui ont reçu des sérums agglutinants, elle agglutine les

Bactéries homologues. La sève élaborée et l'extrait de feuille donnent des résultats moins nets et entachés d'erreurs dues à la présence de « pseudo-anticorps ».

En présence de ces faits, CARBONE et ARNAUDI effectuent l'agglutination parallèlement avec: 1° l'extrait de feuille ou de plante entière; 2° la sève élaborée; 3° la sève brute, provenant de plants inoculés.

La sève élaborée et l'extrait de feuille permettent, comme on pouvait le prévoir, de constater l'agglutination des Bactéries, mais le phénomène est inconstant et aspécifique. Ainsi, la sève élaborée, extraite d'un plant de Mûrier inoculé avec le Bacille typhique, agglutine ce germe dans deux essais, mais, dans deux autres essais, ne l'agglutine pas et agglutine, au contraire, fortement une Bactérie hétérologue, le Vibrien cholérique. La réaction est imputable, par conséquent, à une « pseudo-agglutinine » et non à un anticorps spécifique. Quant à la sève brute, les résultats des essais préliminaires laissaient espérer qu'on pourrait y mettre en évidence des anticorps. Or, elle est dépourvue de toute action agglutinante sur *B. atterimus*, *Bact. typhi*, *Bact. coli* et *V. cholerae*.

DOUSSAIN (1925) n'est pas plus heureux que les savants italiens en essayant la réaction d'agglutination sur le suc de bulbes d'Oignons, inoculés cinq fois avec les Bacilles paratyphiques A et B.

A son tour, Andrée DUPAIX (1933) s'efforce de déterminer la production d'agglutinines végétales. L'auteur inocule à *Opuntia* une Bactérie, *B. caryocyaneus*, qui n'avait jamais servi à de semblables essais. Le suc végétal est extrait par broyage des cladodes inoculés, expression en présence d'eau physiologique, centrifugation et filtration sur disque de verre poreux. Le produit finalement obtenu, dilué dans l'eau physiologique, n'agglutine pas *B. caryocyaneus* de 1/3 à 1/16. Seule, la dilution à 1/2 montre des amas assez nombreux, mais petits et accompagnés d'une grande quantité de plastides libres. Etant donné le peu de netteté du phénomène et la concentration élevée à laquelle il a lieu, l'auteur, fort prudemment, ne conclut pas à une agglutination positive.

Mais on sait que plusieurs facteurs peuvent stabiliser les suspensions bactériennes et que la fixation de l'agglutinine par des suspensions rendues stables n'est pas suivie de l'agglomération des plastides. C'est pourquoi, avant de conclure à l'absence d'agglutinines chez *Opuntia*, A. DUPAIX a cherché (ce que n'avaient pas fait les auteurs précédents) à déterminer les constantes physico-chimiques du liquide végétal en expérience.

Elle constate que la teneur en ions H^+ du liquide est très favorable à l'agglutination; le pH est de l'ordre de 6—6,14. La tension superficielle, de l'ordre de 57 dynes/cm, est voisine de celle du sérum sanguin. Mais l'auteur fait remarquer que les sérums sont généralement employés à des dilutions bien supérieures à celles du liquide végétal utilisé dans ses essais et présentent souvent aux concentrations élevées le « phénomène paradoxal ». On peut donc supposer qu'il y aurait stabilisation de la suspension de *B. caryocyaneus* par le suc d'*Opuntia*, aux concentrations où l'agglutinine y serait encore décelable. Enfin, le suc d'*Opuntia* offre une grande viscosité et ce dernier facteur a pu empêcher la réaction de se produire.

Avec A. DUPAIX, on peut admettre, au moins provisoirement, que les sucx végétaux sont susceptibles de présenter des conditions défavorables à l'agglutination des suspensions bactériennes. Tous les essais que nous venons de citer, s'ils représentent des échecs dans la mise en évidence du pouvoir agglutinogène des plantes vis-à-vis de Bactéries non phytopathogènes, ne démontrent pas irréfutablement l'incapacité de ces plantes à produire des agglutinines.

Il nous reste, d'ailleurs, à parler des expériences de Th. FRÉMONT qui, récemment (1933), a observé des faits qu'elle considère comme positifs.

Cet auteur inocule à des Fèves 0 cm³, 5 à 1 cm³ d'une culture de *B. proteus*, en 3 injections espacées de trois jours. Le suc de ces plantes préparées, extrait par pression, centrifugé et filtré soit sur bougie L3, soit sur terre d'Infusoires ou noir animal, se révèle doué de pouvoir agglutinant vis-à-vis de *B. proteus* (dilution limite d'agglutination: 1/20).

L'extrait de plante préparée, en présence de filtrat de culture de *B. proteus* donne une réaction de précipitation également positive.

De plus, les Fèves préparées avec *B. proteus* élaboreraient un anticorps lysant pour ce germe. Mlle FRÉMONT en trouve la preuve dans les deux faits suivants : 1° l'extrait de plants inoculés fixe 3 doses 1/2 d'alexine, tandis que les plants témoins en fixent seulement 1 dose 1/2; 2° un Cobaye, qui reçoit des injections de suspensions de *B. proteus* additionnées d'extrait de plante préparée avec ce germe, présente des lésions plus graves qu'un Cobaye inoculé avec la Bactérie seule. Ce phénomène serait dû, selon l'auteur, à la présence dans l'extrait végétal, d'un anticorps qui « *amène une lyse rapide du germe et la mise en liberté d'une endotoxine particulièrement active* ».

On ne peut accepter les conclusions de Mlle FRÉMONT que sous réserves de détails que l'auteur n'a pu donner dans la note très courte qui expose son travail.

Remarquons d'abord que la dilution limite d'agglutination est faible pour un germe aussi agglutinable que *B. proteus*. D'autre part, l'auteur ne nous renseigne pas sur l'action des températures élevées à l'égard des anticorps observés, et ne dit rien au sujet de leur spécificité. Or, on sait (BÖHM, 1887) que l'acidité des sucs s'élève chez les plantes qui ont subi une blessure. Les plantes expérimentées par Mlle FRÉMONT étant broyées et exprimées 2 jours seulement après la dernière injection, il est possible que leur suc présente un pH plus acide que les plantes témoins, pH qui provoquerait l'agglutination des plastides et la précipitation des filtrats bactériens.

Les essais de Mlle FRÉMONT ont été repris par CARBONE et ALEXANDRI (1935) qui se sont efforcés de se placer autant que possible dans les mêmes conditions d'expérience. Malheureusement, ces savants n'ont constaté ni agglutination des Bactéries, ni précipitation des extraits bactériens par le suc des plantes préparées.

4) FORMATION D'ANTICORPS PAR INTRODUCTION D'ANTIGÈNES DIVERS

Nous avons vu dans les paragraphes précédents les réactions humorales provoquées chez les plantes par l'inoculation de Bactéries ou de Champignons. Or, on sait que ne sont pas seuls doués de pouvoir antigène ces organismes, mais, en général, toute substance renfermant un complexe protéique. Il était donc intéressant d'étudier la formation par les plantes d'anticorps vis-à-vis de ces substances.

Nous avons dit, à propos des anticorps végétaux normaux, que nombre de sucs végétaux précipitent normalement les sérums. CARBONE et ARNAUDI (1925) sont, à notre connaissance, les seuls auteurs qui aient tenté d'obtenir des précipitines végétales spécifiques de sérums inoculés. A cet effet, ils inoculent du sérum de Cheval, de Cobaye ou du sérum humain à *Prunus laurocerasus* et à *Morus alba*. Mais leurs réactions sont, ou négatives ou aspécifiques et, dans ce cas, imputables, sans doute, à une « pseudo-précipitine » normale.

L'individu d'une espèce animale donnée qui reçoit des injections de globules rouges d'une autre espèce, élabore un anticorps spécifique ou sensibilisatrice qui, en présence de l'alexine, substance normale du sérum, détermine *in vitro* la lyse des globules préparants.

Plusieurs auteurs ont trouvé chez les Végétaux des propriétés hémolytiques normales. Les Végétaux seraient-ils capables d'acquérir des propriétés hémolytiques spécifiques?

C'est ce problème qu'a voulu résoudre CARBONE en 1920. Il avait d'abord paru au savant italien que les propriétés hémolytiques normales du suc de Pomme de terre étaient susceptibles d'être augmentées par inoculation d'hématies. CARBONE institue une série d'expériences afin de contrôler ce fait. A l'aide d'une pipette, il introduit dans une cavité creusée à l'intérieur du tubercule des hématies de Mouton, mises en suspension dans l'eau physiologique. Les sucs de tubercules, obtenus par pression, sont dilués à 1/10, et utilisés pour trois séries d'essais parallèles comportant respec-

tivement: a) des hématies de Mouton; b) des hématies additionnées d'alexine; c) des hématies additionnées de sensibilisatrice.

Après 18 heures de séjour à la température du laboratoire, les séries a et c montrent une légère hémolyse, la série b une hémolyse nette. Dans toutes les séries témoins contenant du suc de Pomme de terre non inoculée, les hématies restent intactes.

Malgré les difficultés d'interprétation des réactions hémolytiques, les faits observés par CARBONE semblent plaider en faveur de la production par les plantes d'une sensibilisatrice spécifique. Malheureusement, d'autres expériences effectuées avec du suc chauffé lui ont donné des résultats assez contradictoires avec les précédents.

L'absorption par les Végétaux des antigènes introduits par les procédés habituels étant peut-être imparfaite, CARBONE et FRANÇA (1923) ont l'idée de nourrir une plante carnivore avec des hématies de Mouton. L'examen microscopique montre, en effet, que les hématies sont parfaitement assimilées. Néanmoins, l'extrait chlorosodique de la feuille ou des glandes ne montre pas l'acquisition par la plante d'un principe hémolytique.

PICADO (1921) avait lui aussi essayé, mais sans succès, de mettre en évidence des anticorps lysants dans le suc de cladodes d'*Opuntia*, inoculés avec des globules rouges de Lapin.

Mais l'emploi comme antigène, également vis-à-vis d'*Opuntia*, de cellules végétales telles que les grains de pollen ont fourni à PICADO des résultats importants.

Cet auteur injecte une raquette d'*Opuntia* avec des grains de pollen de maïs, mis en suspension soit dans l'eau pure, soit dans l'eau glucosée à 10 p. 100. Huit jours après l'injection, les tissus devenus friables sont pressés; le suc est filtré sur coton puis centrifugé. Avec ce suc, PICADO effectue la réaction microscopique: à une quantité constante de suspension de grains de pollen (8 gouttes) sont ajoutées des doses croissantes de suc d'*Opuntia* préparée (2, 4 et 8 gouttes). Un témoin comporte des quantités égales de suspension et de suc d'*Opuntia* non préparée.

Après 1 heure et demie de contact, le pollen est fortement lysé dans le cristalliseur contenant 8 gouttes de suc de plante inoculée; avec 2 gouttes, la lyse est à peine perceptible. La lyse est accompagnée d'agglutination. Dans le témoin, au contraire, le pollen reste intact. Il se serait donc développé dans *Opuntia*, sous l'influence de l'antigène, des agglutinines et des cytolyssines.

Ces anticorps sont spécifiques « de groupe », c'est-à-dire qu'ils sont actifs à l'égard du pollen d'autres Graminées, mais sont sans effet sur le pollen d'espèces éloignées. En ce qui concerne la résistance aux températures élevées, contrairement à ce qui a été observé pour la plupart des anticorps végétaux, les anticorps d'*Opuntia* sont sensibles à une assez faible élévation de température. Le chauffage à 56° C. durant 15 minutes ou à 45° C. durant 30 minutes du suc d'*Opuntia* inoculée supprime son action lysante et agglutinante. Mais, si on additionne le suc ainsi inactivé de suc de plante neuve, non chauffé, la propriété lytique et agglutinante se manifeste à nouveau. Ces faits semblent démontrer qu'*Opuntia* est capable d'élaborer un anticorps lysant comparable aux anticorps lysants des Animaux, c'est-à-dire composé de deux substances, une thermostable, une thermolabile. Il semblerait aussi que l'agglutinine d'*Opuntia*, en cela très différente des agglutinines animales, ne peut agir qu'en présence de la substance thermolabile. Mais PICADO donne une autre interprétation de ce phénomène: les grains de pollen seraient trop gros pour être agglutinés sans avoir été préalablement lysés (1) et, par suite, l'absence de lyse dans le suc chauffé entraînerait l'absence d'agglutination.

5) FORMATION D'ANTICORPS PAR GREFFE

Pour terminer le chapitre des anticorps spécifiques chez les Végétaux, il nous reste à exposer une série de travaux qui utilisent une technique toute particulière. C'est à KOSTOFF

(1) Il est à remarquer, en effet, que, dans les réactions étudiées par PICADO, la lyse précède l'agglutination, tandis que c'est l'ordre inverse qui s'observe dans les réactions humérales des Animaux.

que revient le mérite d'avoir, le premier, dirigé les recherches dans cette voie (1928-1931).

D'après KOSTOFF, les insuccès nombreux rencontrés dans les essais de production d'anticorps végétaux sont dus à l'impossibilité d'introduire chez les plantes une quantité suffisante d'antigène par les procédés employés habituellement: inoculation des suspensions microbiennes à la seringue, à la pipette, etc.

On sait, d'autre part, que les Ecoles allemandes de Königsberg (1924-1926) et de Berlin (1927) sont parvenues, par injection d'extraits de graines de plantes à des Animaux, à obtenir des sérums doués de pouvoir précipitant spécifique vis-à-vis de ces extraits. On a pu même, grâce à cette technique, établir des parentés entre les plantes du point de vue de leur teneur en protéines.

Ces faits ont incité KOSTOFF à employer comme antigène pour les plantes, des plantes d'espèce différente. Il réalise le contact entre les deux plantes par le procédé de la greffe. Une union intime est ainsi obtenue, car il y a échange constant de sève entre les deux organismes. Il semble, par conséquent, que l'on se trouve dans les meilleures conditions possibles pour observer une réaction d'un organisme sur l'autre.

L'auteur effectue le greffage entre diverses plantes de la famille des Solanacées; après des temps variant entre 5 et 100 jours il met en évidence les réactions réciproques du sujet et du greffon, soit par la technique de précipitation, soit en mesurant le pouvoir lytique d'un des sucs sur les protéines de l'autre suc.

L'essai de précipitation se complique du fait des précipitines que contiennent normalement les plantes vis-à-vis des sucs d'autres espèces. Aussi, l'auteur a-t-il soin de faire porter des expériences sur des séries témoins renfermant les extraits de plants normaux des espèces employées comme sujet et greffon. Les résultats de ces essais montrent un pouvoir précipitant réciproque plus élevé chez les plantes unies par greffage que chez ces mêmes plantes libres.

Le pouvoir précipitant des extraits « immunisés » est diminué et finalement détruit par chauffage durant 30 minu-

tes à des températures allant de 25° C. à 100° C. Les précipitines normales paraissent moins sensibles à l'élévation de température. La saturation des extraits par le sulfate de magnésium, le sulfate de soude, le bichromate de lithium, suivie de filtration, entraîne la disparition du pouvoir précipitant, mais la saturation par le sulfate d'ammoniaque le laisse intact.

Outre l'action précipitante des extraits « immunisés » à l'égard des extraits normaux, KOSTOFF constate l'acquisition par le greffon de lysines vis-à-vis des protéines du sujet correspondant. Il mesure le pouvoir lytique en plaçant les extraits des plantes expérimentées dans des dialyseurs qui laissent passer les peptones et les acides aminés, mais retiennent les protéines. La quantité d'acides aminés et de peptones est déterminée à l'aide d'une méthode colorimétrique (ninhydrine.)

L'expérience montre que l'extrait de *Solanum lycopersicum*, par exemple, greffé sur *Datura ferox*, produit une protéolyse beaucoup plus intense de l'extrait de *Datura* que l'extrait de *Solanum* normal.

Les résultats de ces essais *in vitro* recevraient une preuve du fait qu'ils semblent expliquer des phénomènes observés *in vivo*. KOSTOFF a, en effet, complété les recherches précitées par des études morphologiques et cytologiques sur les plantes greffées. Notons seulement le fait suivant. Dans certains cas, un greffon porté par une plante, après avoir poussé vigoureusement un certain temps, meurt. Si l'on essaie sur le même sujet de nouvelles greffes avec des greffons de même espèce que dans le premier cas, ces greffes meurent immédiatement. L'arrêt de la croissance du premier greffon, l'impossibilité d'en obtenir de nouveaux seraient dus aux anticorps spécifiques élaborés par le sujet.

La méthode si nouvelle de KOSTOFF devait tenter plusieurs chercheurs.

SILBERSCHMIDT (1931-1932) a fort bien étudié les conditions expérimentales à observer si l'on veut réduire au minimum les causes d'erreur. Effectués dans ces conditions, ses travaux ne confirment pas les résultats de KOSTOFF. En pre-

mier lieu, le pouvoir précipitant des extraits normaux varie tellement d'une plante à l'autre qu'il ne peut servir de terme de comparaison dans l'étude des précipitines acquises. De plus, le pouvoir précipitant des extraits de symbiotes, s'il paraît quelquefois assez élevé, est dépourvu de toute spécificité. En résumé, SILBERSCHMIDT ne croit pas une immunisation active chez les plantes greffées.

CHESTER (1932), CHESTER et WHITAKER (1933) ont aussi apporté une importante contribution à l'étude de cette catégorie d'anticorps.

Leurs travaux les amènent à conclure que les réactions de précipitation et de lyse constatées avec les sucres de plantes greffées sont dues à des substances non protéiques et, par conséquent, ne sont pas de nature immunitaire. De plus, les auteurs n'ont jamais observé les phénomènes morphologiques et cytologiques notés par KOSTOFF. Aussi estiment-ils que ce sont des caractères accidentels, nullement généralisables et qui ne sauraient s'expliquer par des réactions anticorps.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

Agglutination de différentes Bactéries par le suc de Citron

Généralités

Dans la partie de ce travail consacré à l'historique des agglutinines végétales, nous avons relaté qu'en 1922 VIGLIANO avait observé les propriétés agglutinantes du suc de Citron (*Citrus lemonum*) à l'égard de différentes Bactéries et que, récemment (1933), G. VISCO a repris, de façon approfondie, l'étude de l'agglutination bactérienne par le suc de ce fruit.

Voici quelques détails sur l'expérimentation de VISCO.

Cet auteur soumet à la pression des Citrons bien mûrs et récemment cueillis (depuis 24 heures au plus). Le suc obtenu est centrifugé, filtré sur papier et, après dilution dans l'eau physiologique, mis en présence des suspensions de différentes Bactéries: Vibrion cholérique, Bacille typhique, Bacilles paratyphiques, Bacille de Shiga, Bacille de Bang, *Micrococcus melitensis*. (Ces germes sont vivants ou tués par chauffage à une température convenable.) Dans ces conditions les Bactéries sont agglutinées à des dilutions limites variant, suivant les fruits utilisés, de 1/60 à 1/700. L'agglutination présente presque toujours le « phénomène paradoxal ».

A priori, l'interprétation de ces résultats paraît devoir être fournie par l'acidité élevée que présente le suc de Citron,

due à sa teneur en acide citrique. (VISCO évalue cette teneur à 5 % environ.) VISCO constate, en effet, que des solutions d'acide citrique agglutinent toutes les Bactéries sensibles à l'action précipitante du suc de Citron.

Par contre, le chauffage du suc de Citron pendant 30 minutes à 60° fait disparaître complètement son pouvoir agglutinant, alors qu'une solution d'acide citrique, après chauffage prolongé, a conservé évidemment ses propriétés agglutinantes.

Mais VISCO observe le fait suivant qui paraît, au premier abord, assez surprenant. Du suc de Citron, privé par chauffage de propriétés agglutinantes, est additionné d'acide citrique, en quantité telle que puisse se produire l'agglutination acide; or ce mélange, mis en présence de Bactéries, ne les agglutine pas. Ce phénomène s'expliquerait, selon VISCO, par la formation dans le suc, au cours du chauffage, d'une substance empêchante, « stabilisante ».

En présence de ces faits, le lecteur peut se demander si l'agglutination due au suc de Citron n'est pas une agglutination acide que le chauffage ne détruirait pas, mais « empêcherait ». Ce n'est pas cependant cette conclusion qui s'impose à VISCO car plusieurs faits la contredisent.

1° Certains Citrons sont dénués de pouvoir agglutinant, bien que leur acidité soit aussi élevée que celle des autres fruits expérimentés.

2° Le suc de Citron agglutine à des dilutions où sa teneur en acide est inférieure à la quantité d'acide citrique nécessaire pour déterminer l'agglutination par les ions H^+ .

3° L'essai de saturation (méthode de CASTELLANI) par le Vibrion cholérique dépouille le suc de Citron de ses propriétés agglutinantes, comme s'il y avait fixation d'agglutinine par les plastides. VISCO remarque cependant que l'« agglutinine » ainsi fixée n'est pas spécifique, car, « saturé » par le Vibrion cholérique, le suc de Citron perd son pouvoir agglutinant non seulement pour ce germe, mais encore pour toutes les autres Bactéries expérimentées.

VISCO conclut, de l'ensemble de ces faits, que l'aggluti-

nation par le suc de Citron n'est pas due aux ions H^+ , mais à une « pseudo-agglutinine », au sens de CARBONE.

Technique

Choix du matériel bactérien.

Les essais décrits dans ce chapitre ayant eu pour but la recherche d'agglutinines « normales » dans le suc de Citron, il nous a paru indiqué d'expérimenter sur quelques Bactéries du sol avec lesquelles les Végétaux se trouvent en contact permanent: *B. subtilis* (Neisser) ⁽¹⁾, *B. subtilis* (Michigan) ⁽¹⁾, *B. subtilis* (Marburg) ⁽¹⁾, *B. mesentericus niger* (COURMONT-ROCHAIX) ⁽¹⁾, *B. megatherium* (CALMETTE) ⁽¹⁾.

Nous avons également utilisé quelques germes dont le choix nous a été dicté par leur haute agglutinabilité et des considérations d'ordre pratique telles que la facilité avec laquelle ces germes donnent des suspensions homogènes ; ce sont : *B. pyocyaneus* var. *pyocyanogenes*, *B. chlororaphis*, *B. prodigiosus*, *B. balticus*, *B. caryocyaneus*.

Milieu de culture. Préparation des suspensions.

Les Bactéries sontensemencées (au moyen de quelques cm^3 de suspension en eau physiologique) sur gélose peptone de $pH = 7$, répartie en boîtes de Roux. Après 40 heures de culture à la température du laboratoire, la gélose est recouverte sur toute son étendue d'un enduit bactérien. Les germes sont alors mis en suspension dans l'eau stérile (distillée ou physiologique suivant les cas) et soumis à trois lavages successifs destinés à éliminer toute trace de milieu nutritif ⁽²⁾. Pour obtenir des suspensions aussi homogènes que possible (c'est-à-dire ne renfermant que des plastides isolées), les germes, après lavage, sont agités avec des billes de verre. Bien que la durée de cette opération soit parfois assez pro-

(1) Le nom entre parenthèses indique la collection d'où provient la souche utilisée.

(2) L'emploi de germes non rigoureusement lavés donnerait des résultats entachés d'erreur.

longée (dans certains cas 45 minutes), il peut subsister des amas, par exemple avec les germes sporogènes. Ces amas sont éliminés par une centrifugation fractionnée de quelques secondes. Le liquide décanté, riche en germes (200 à 400 milliards au cm^3) est dilué dans l'eau (distillée ou physiologique) de façon à donner un système renfermant environ 8 milliards de germes au cm^3 .

Obtention du suc de Citron.

Il nous était évidemment impossible, sous notre climat, de nous procurer des Citrons fraîchement cueillis, comme l'avait fait VISCO. Mais il a été observé au Laboratoire de Monsieur le Professeur Lasseur, que le pouvoir agglutinant des sérums, après avoir subi une chute rapide dans les premiers temps qui suivent l'obtention des sérums, ne diminue ensuite que faiblement et lentement avec le temps. Des expériences récentes ont montré que des sérums âgés de plusieurs années agglutinent encore les germes homologues à des dilutions limites élevées. Etant donnée l'analogie que l'on peut supposer entre les agglutinines animales et les agglutinines végétales, il est permis de croire que celles-ci persistent dans un organe végétal un temps assez long après sa séparation du plant entier. Nous avons donc expérimenté sur des Citrons d'importation.

Pour chaque expérience, plusieurs fruits (4 à 10) sont soumis à la pression, afin d'éviter les variations individuelles et obtenir des résultats moyens.

Le liquide exprimé est centrifugé à 12.000 tours pendant 10 minutes environ, ce qui donne un liquide suffisamment clair pour la lecture des résultats.

Dans quelques cas seulement, la centrifugation est suivie de filtration sur bougie Chamberland L2 ou L3.

Pour certains essais, le suc est utilisé après chauffage à des températures de 60° à 80° C.

Le liquide ayant subi ces manipulations est employé immédiatement aux essais d'agglutination, à des dilutions crois-

santes effectuées soit dans l'eau distillée, soit dans l'eau physiologique.

Protocole d'expérience.

1° Les mélanges « suc de Citron + suspension bactérienne » sont réalisés en tubes de verre résistant. On introduit dans chacun de ces tubes 1 cm³ de suspension (contenant 8 milliards de germes au cm³), auquel on ajoute 1 cm³ de suc de Citron convenablement dilué. La concentration finale en germes est donc de 4 milliards de germes au cm³. Les dilutions des différents systèmes sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU I

Désignation des systèmes	Composition des systèmes agglutinants	Dilution finale du suc de Citron dans le système agglutinant
a	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/12,5	1/25
b	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/25	1/50
c	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/50	1/100
d	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/100	1/200
e	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/200	1/400
f	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/250	1/500
g	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/300	1/600
h	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/400	1/800
i	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/600	1/1200
j	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/800	1/1600
k	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de Citron dilué à 1/1600	1/3200
témoin	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ eau distillée ou physiologique	

Les mélanges sont soigneusement agités et placés à l'étuve à 37° C. Ils sont examinés au bout de 4 heures. L'examen

à l'œil et à la loupe est, en général, suffisant. Dans quelques cas cependant, lorsque l'agglutination est douteuse, les systèmes sont examinés au microscope, entre lame et lamelle.

2° La réaction d'agglutination effectuée dans ces conditions permet d'évaluer la dilution limite d'agglutination, mais cette donnée est, à elle seule, insuffisante à caractériser le phénomène. Aussi, afin d'apporter plus de précision dans nos résultats et nous permettre d'en établir la représentation graphique, avons-nous mesuré le trouble des différents systèmes en expérience.

Les séries indiquées dans le tableau ci-dessus comportent des quantités de liquide très faibles destinées à faciliter la lecture à l'œil ou à la loupe, mais ne permettent pas des mesures qui, elles, exigent un volume assez considérable de liquide. Parallèlement à ces séries, nous avons donc préparé des systèmes en gros tubes (également en verre résistant), dans lesquels étaient distribués 15 cm^3 de suspension bactérienne auxquels on ajoutait 15 cm^3 de suc dilué comme précédemment. Les mélanges étaient également laissés en contact 4 heures, à la température de 37°C .

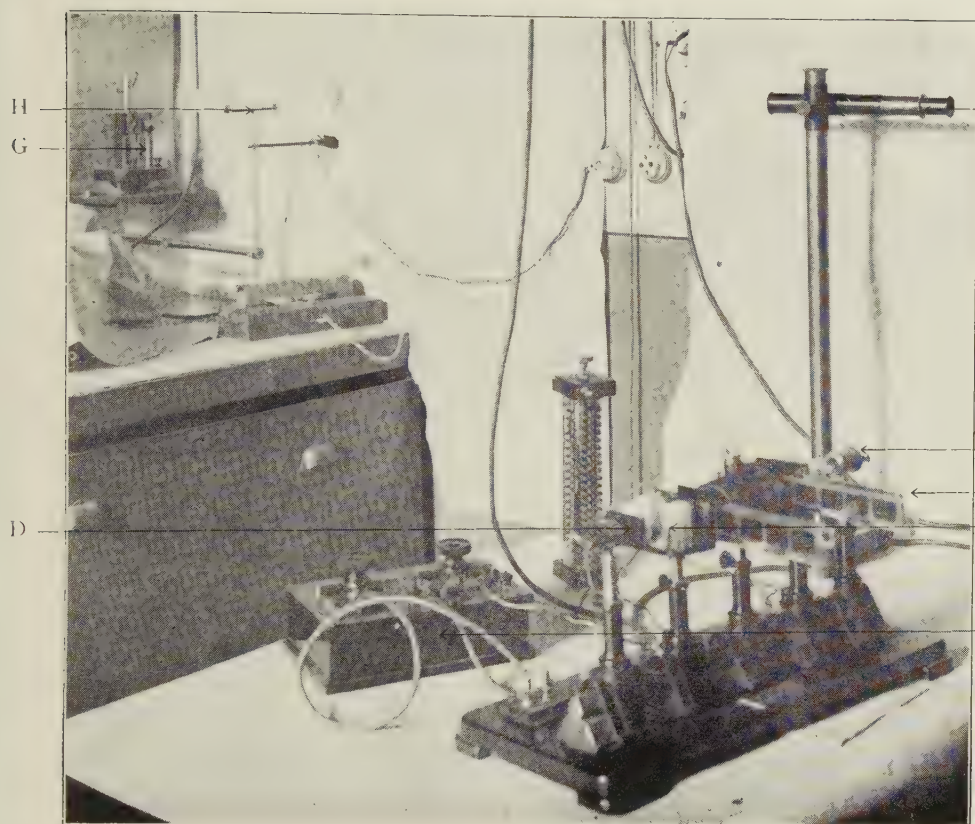
On prélevait alors 15 cm^3 de liquide dont on évaluait le trouble, variable suivant l'intensité de la précipitation, à l'aide du néphéloabsorptiomètre de Kipp.

Mesure du trouble.

Le néphéloabsorptiomètre de Kipp (planche I), utilisé pour nos mesures d'absorption, se compose essentiellement de deux piles thermoélectriques entre lesquelles est placée une source de lumière incandescente qui les éclaire à travers deux cuves identiques à faces parallèles. Deux shunts sont connectés aux bornes des piles. Piles et shunts sont reliés en opposition à un galvanomètre de Moll.

L'appareil étant réglé, une des cuves est remplie d'eau distillée, l'autre du liquide destiné à la mesure. L'absorption de lumière par ce liquide, supérieure à l'absorption par l'eau, détermine à la pile correspondante une diminution d'inten-

PLANCHE I



Néphéloabsorptiomètre de Kipp.

- A : pile thermoélectrique ;
- B : filtres colorés ;
- C : cuve ;
- D : fente réglable ;
- E : potentiomètre ;
- G : galvanomètre de Moll ;
- H : échelle graduée ;
- K : lunette.



sité de courant qui se traduit par une déviation du galvanomètre. On annule cette déviation en diminuant la résistance du shunt subdivisé. La lecture de ce shunt donne directement l'absorption en pour cent de la cuve à eau distillée prise comme étalon.

De légères modifications ont été apportées à cet appareil: une fente réglable y a été adaptée qui facilite la mise au zéro et un écran permet d'opérer en lumière monochromatique.

Détermination du pH.

Connaître avec précision le pH des systèmes agglutinants était des plus importants pour interpréter les résultats. Les mesures de pH ont été effectuées par la méthode électrométrique, à l'aide de l'électrode à hydrogène rotative de LE-COMTE du NOUY, du potentiomètre de TINSLEY et du galvanomètre de d'ARSONVAL, construit par TINSLEY. Dans certains cas, ces mesures ont été contrôlées par des mesures effectuées avec l'électrode à quinhedrone d'ATEN.

Mesures de conductibilité.

Dans plusieurs séries d'expériences, nous avons cherché à évaluer la teneur en électrolytes des systèmes et, à cet effet, déterminé leur conductibilité. Pour ces mesures, le Laboratoire possède un appareil dont la source alternative est constituée par une hétérodyne à fréquence musicale, suivie d'un étage amplificateur, l'écouteur étant remplacé par un haut-parleur. Ce dispositif permet d'obtenir une zone de silence absolu, bien délimitée et fournit, par conséquent, des résultats d'une grande précision ⁽¹⁾. L'appareil utilise, en outre, la boîte de résistances à contact dual de TINSLEY.

(1) Pour plus de détails, voir: LASSEUR, JOUAVILLE, DUPAIX et MARCHAL, Bull. Assoc. Diplômés Microbiologie, n° 6, pp. 41-48, mai 1933; PH. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR, Giorn. di Batt. e Immunol. Vol. IX, n° 5, pp. 1-12, nov. 1933.

Résultats expérimentaux

Dilution limite d'agglutination.

Nos essais effectués plusieurs fois avec chacun des germes utilisés nous ont donné les résultats suivants:

1° Le suc de Citron n'agglutine pas (en eau distillée ou en eau physiologique) *B. caryocyaneus*, *B. mesentericus niger* (COURMONT-ROCHAIX), *B. megatherium* (CALMETTE).

2° Le suc de Citron agglutine: *B. pyocyaneus*, *B. chlororaphis*, *B. prodigiosus*, *B. balticus*, *B. subtilis* (Neisser), *B. subtilis* (Michigan), *B. subtilis* (Marburg).

Les dilutions limites d'agglutination, différentes suivant l'espèce bactérienne, sont données dans le tableau II.

TABLEAU II

Désignation des espèces bactériennes	Dilution limite d'agglutination
<i>B. pyocyaneus</i> var. <i>pyocyanogenes</i> ...	1/25
<i>B. chlororaphis</i>	1/200
<i>B. prodigiosus</i>	1/1600
<i>B. balticus</i>	1/1600
<i>B. subtilis</i> (Neisser)	1/800
<i>B. subtilis</i> (Michigan).	1/1600
<i>B. subtilis</i> (Marburg)	1/100

Les valeurs données dans le tableau ci-dessus sont celles des dilutions limites les plus élevées qui aient été observées avec chaque germe. Dans certains essais, la dilution limite était un peu inférieure, comme l'indique le tableau suivant.

TABLEAU

TABLEAU III

Désignation des espèces bactériennes	Dilutions limites d'agglutination observées dans les différents essais
<i>B. prodigiosus</i>	1/800; 1/1200; 1/1600
<i>B. balticus</i>	1/200; 1/800; 1/1200; 1/1600
<i>B. subtilis</i> (Neisser)	1/200; 1/600; 1/800
<i>B. subtilis</i> (Michigan)	1/800; 1/1200; 1/1600

Aspect de l'agglutination.

L'allure de la réaction est très différente suivant les germes expérimentés.

1° Avec *B. chlororaphis*, *B. balticus*, l'intensité de l'agglutination décroît régulièrement à mesure qu'augmente la dilution du suc de Citron.

Le tableau suivant schématise l'aspect de l'agglutination de *B. balticus*.

TABLEAU IV

Agglutination de *B. balticus* par le suc de Citron

Dilution du suc de Citron en eau physiologique	Aspect des systèmes agglutinants
1/25	dépôt, flocons
1/50	dépôt, flocons
1/100	dépôt, flocons
1/200	dépôt, flocons
1/400	dépôt, fin précipité
1/500	fin précipité
1/600	très fin précipité
1/800	très fin précipité
1/1200	homogène
1/1600	homogène
1/3200	homogène
témoin	homogène

2° L'agglutination de *B. prodigiosus*. *B. subtilis* (Michigan) et *B. subtilis* (Neisser) présente le « phénomène paradoxal » : l'intensité de l'agglutination étant moins grande aux fortes concentrations du suc de Citron qu'à certaines dilutions élevées.

La « vorzone » est particulièrement nette avec *B. prodigiosus* comme on peut le constater par la lecture du tableau V.

TABLEAU V

Agglutination de *B. prodigiosus* par le suc de Citron

Dilution du suc de Citron en eau physiologique	Aspect des systèmes agglutinants
1/25	homogène
1/50	homogène
1/100	homogène
1/200	homogène
1/400	homogène
1/500	homogène
1/600	homogène
1/800	précipité, liquide clair
1/1200	précipité, liquide clair
1/1600	précipité, liquide louche
1/3200	homogène
témoin	homogène

L'agglutination de *B. subtilis* (Michigan), sans présenter comme celle de *B. prodigiosus* une zone de précipitation nulle, offre néanmoins un maximum très net aux dilutions de 1/200 et 1/400.

Avec *B. subtilis* (Neisser) la réaction (schématisée dans le tableau ci-dessous), comporte deux maxima de précipitation : à la dilution de 1/25 et de la dilution 1/600 à la dilution 1/800.

TABLEAU VI

Agglutination de *B. subtilis* (Neisser) par le suc de Citron

Dilution du suc de Citron en eau physiologique	Aspect des systèmes agglutinants
1/25	dépôt, liquide presque clair
1/50	dépôt, liquide louche
1/100	dépôt, liquide louche
1/200	dépôt, liquide louche
1/400	dépôt, fin précipité
1/500	dépôt, fin précipité
1/600	dépôt, liquide presque clair
1/800	dépôt, liquide presque clair
1/1200	homogène
1/1600	homogène
1/3200	homogène
témoin	homogène

Après avoir décrit l'agglutination de différentes Bactéries par le suc de Citron, nous allons, dans les pages qui suivent, montrer comment nous avons essayé d'en donner une interprétation aussi satisfaisante que possible.

Deux hypothèses d'explication se présentaient: 1° l'agglutination par le suc de Citron est due à l'action des ions H^+ ; 2° l'agglutination par le suc de Citron est due à une agglutinine normale ou tout au moins à une « pseudo-agglutinine ».

On peut supposer aussi que le phénomène est compliqué par la présence simultanée des deux réactions. Dans ce cas, l'expérimentation doit s'efforcer de les séparer.

Hypothèse de l'agglutination par les ions H^+ .

Nous avons déjà rappelé dans l'introduction de ce travail que l'action précipitante des substances chimiques à l'égard des Bactéries a été découverte par le savant belge MALVOZ

(1897). MICHAELIS (1911) a eu le mérite incontestable d'en donner l'interprétation quantitative.

Les Bactéries en suspension dans l'eau distillée possèdent une charge négative qui est un des facteurs de stabilité des suspensions bactériennes. (Cette charge peut être mise en évidence et mesurée par la méthode d'électrophorèse.) La présence d'ions positifs dans une suspension abaisse la charge des plastides, diminue, par conséquent, les forces de répulsion qu'elles exercent entre elles, et entraîne leur précipitation.

On a souvent considéré que les plastides précipitent au point isoélectrique, c'est-à-dire quand leur charge est complètement neutralisée. En réalité, il suffit que cette charge soit abaissée jusqu'à une certaine valeur qu'on nomme différence de potentiel critique. Ceci s'explique par le fait que l'apport d'ions positifs ne modifie pas seulement la charge des plastides mais augmente les forces d'attraction.

Les cations à charge simple $+$ ont un pouvoir précipitant évidemment inférieur à celui des ions à charge double $++$, et ceux-ci ont un pouvoir précipitant moindre que les ions à charge triple $+++$. Mais des différences notables s'observent dans la précipitation par des ions de même valence, et les ions H^+ , en particulier, ont un pouvoir précipitant notablement plus élevé que les autres cations à charge simple.

L'agglutination acide des Bactéries a été étudiée par de nombreux auteurs. Rappelons seulement les travaux de: LAMBOTTE et BOSSAERT (1897); ROST (1911); JAFFE (1912); BENIASCH (1912); POPPE (1912); HEIMANN (1913); SGALITZER (1913); KRUMWIEDE et PRATT (1913); EISENBERG (1919); KUSTER, LANGE et POTTHOFF (1920); LASSEUR (1921); HIRSCH (1922, 1924); REED (1924); FALK et HARRISSON (1926); DURAND, ANDERSON et LUMBROSO (1926); LASSEUR (1928); LASSEUR, MOREL et DUPAIX (1929); LASSEUR, DUPAIX et DOMBRAY (1931); LASSEUR, VERNIER, DUPAIX et COMBE (1931); DAMBOVICEANU (1933); YAMAHARA (1933); LASSEUR, DUPAIX-LASSEUR et RENAUX (1934).

On sait que le suc de Citron est notablement acide. Son

pH a été mesuré par différents auteurs: voici quelques-unes des valeurs observées.

TABLEAU VII

Auteurs	pH du suc de Citron
J. HEMPEL (1927) ⁽¹⁾	2, 19 — 2, 25
CLARK et LUBS (1922) ⁽¹⁾	2, 2
CLERDON et CHARP ⁽¹⁾	2, 32
H. KAULBERSZ-MARYNOWSKA (1933)	2, 3 — 2, 5

Nous avons déterminé, à notre tour, le pH du mélange de suc utilisé à chacun de nos essais. Les valeurs, assez différentes d'une expérience à l'autre, sont données ci-dessous.

TABLEAU VIII

Désignation du mélange	pH
A	2,03
B	2,10
C	2,13
D	2,17
E	2,18
F	2,18
G	2,20
H	2,25
I	2,30
J	2,37

Le pH du suc de Citron présentant une valeur variable avec le mélange en expérience, le pH des différentes dilutions du suc, additionnées de suspension microbienne varie aussi avec chaque essai. Cependant, le suc de Citron possédant un

(1) in H. KAULBERSZ-MARYNOWSKA.

pouvoir tampon élevé, il reste, en général, très acide jusqu'à une dilution assez grande.

Ci-dessous sont indiqués les pH dans quelques essais des systèmes renfermant une partie de suc dilué + une partie de suspension bactérienne.

TABLEAU IX

Dilution finale du suc de Citron dans le système agglutinant	pH dans les essais			
	A	B	C	D
1/25	2,50	2,56	2,58	2,59
1/50	2,66	2,64	2,78	2,70
1/100	2,84	2,90	3,00	2,96
1/200	3,08	3,15	3,23	3,24
1/400	3,40		3,90	3,65
1/500	3,50		3,94	3,82
1/600	3,65			4,10
1/800	3,90			4,60
1/1200	4,75			4,80
1/1600	5,37			5,00
1/3200	5,97			

Afin de nous rendre compte si l'agglutination des Bactéries par le suc de Citron est due aux ions H + des systèmes, nous avons essayé de précipiter par des solutions acides les différentes espèces bactériennes qu'agglutine ce suc.

A cet effet, nous avons utilisé: l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide citrique ⁽¹⁾ et les solutions tampons de DAVIS ⁽¹⁾, dans lesquelles le citrate de soude était substitué au citrate de potassium.

Les systèmes comprenant: une partie de suspension bactérienne + une partie de solution acide ou de dilution du suc ont été examinés (après 4 heures de séjour à la température

(1) La comparaison de la précipitation par le suc de Citron avec celle que produit ces solutions devait fournir une indication particulièrement précieuse.

de 37° C.) au néphéloabsorptiomètre de Kipp. A l'aide des mesures ainsi effectuées, nous avons construit, en fonction du pH, des courbes qui permettent une comparaison précise entre les diverses précipitations.

Nous résumons dans les figures 1 et 2 les résultats obtenus avec *B. chlororaphis* et *B. prodigiosus*.

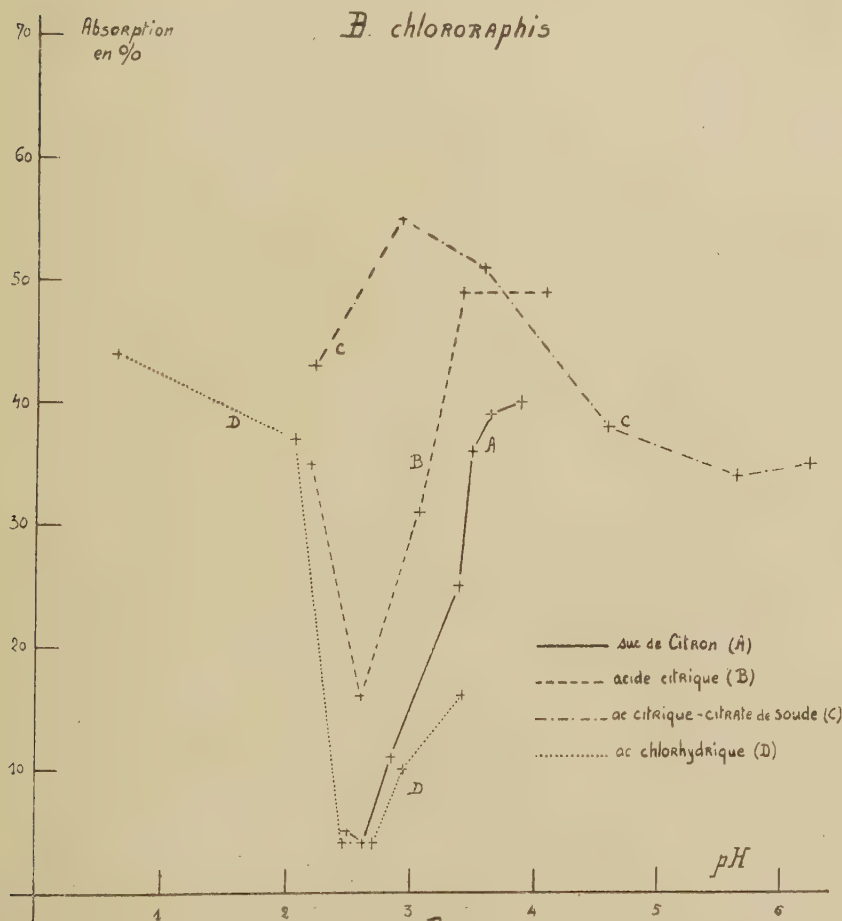
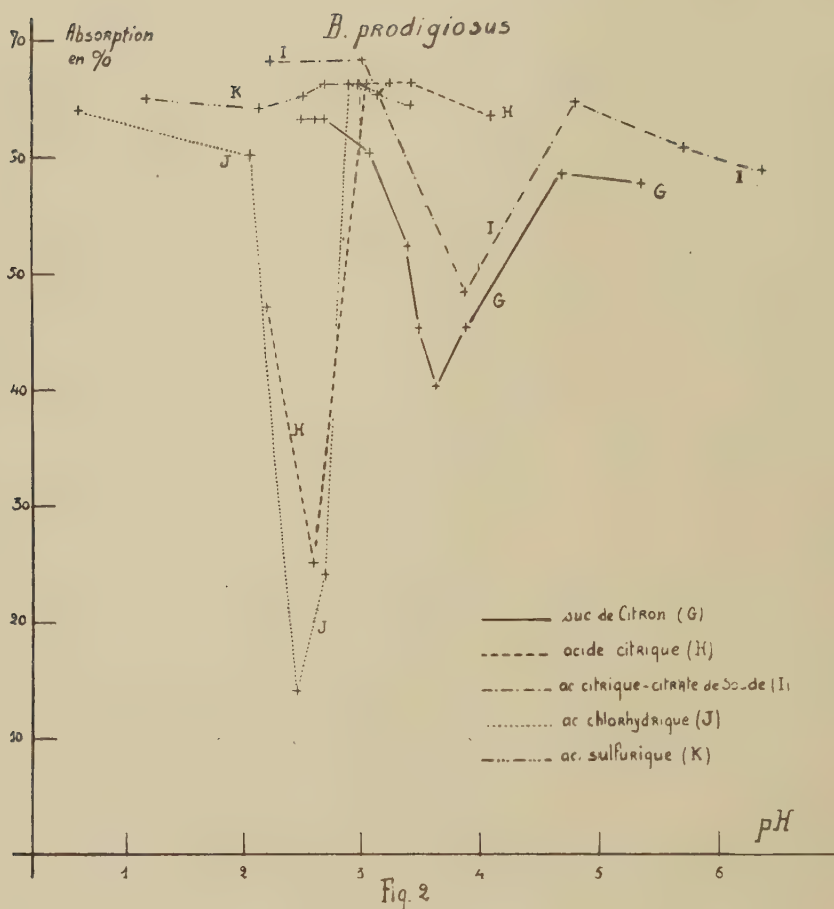


Fig. 1

Variation de l'absorption des suspensions de *B. chlororaphis*
en fonction du pH



Variation de l'absorption des suspensions de *B. prodigiosus*
en fonction du pH

La lecture de la figure 1 montre que *B. chlororaphis* précipite par l'acide chlorhydrique, l'acide citrique et les solutions tampons acide citrique + citrate de soude. Avec l'acide chlorhydrique (courbe D) et l'acide citrique (courbe B) comme avec le suc de Citron (courbe A), le maximum de précipitation se trouve aux environs de $\text{pH} = 2,6$. De plus, ces trois courbes, bien qu'exprimant des différences dans l'intensité de la précipitation, présentent un parallélisme très net. Par contre, la courbe de précipitation par les solutions

tampons (courbe C) offre une allure très différente, avec une augmentation d'absorption de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 2,9$. Mais on sait que la floculation des solutions colloïdales est précédée d'un grossissement des particules (invisible à l'œil) qui entraîne un accroissement d'opacité de la solution. La suspension bactérienne pouvant, dans ce cas, être assimilée à un suspensoïde à grosses particules, il faut interpréter le maximum d'absorption à $\text{pH} = 2,9$ comme un début d'agglutination. Ainsi le maximum de précipitation par les solutions tampons « acide citrique + citrate de soude » est sensiblement le même qu'avec les autres solutions acides.

Voyons maintenant ce qui a été observé dans la précipitation des suspensions de *B. prodigiosus*.

L'acide sulfurique (courbe K) ne les influence pas sensiblement. Par contre, l'acide chlorhydrique (courbe J) et l'acide citrique (courbe H) les précipitent de façon intense à des pH très voisins: $\text{pH} = 2,45$ et $\text{pH} = 2,60$. En présence des solutions tampons de DAVIS (courbe I), les suspensions de *B. prodigiosus* précipitent à un pH moins acide: $\text{pH} = 3,88$. Ce maximum de précipitation est voisin de celui que l'on constate avec le suc de Citron (courbe G): $\text{pH} = 3,65$. Ces deux dernières courbes offrent d'ailleurs une similitude frappante.

En ce qui concerne *B. caryocyaneus*, *B. mesentericus niger*, *B. megatherium*, la non-précipitation de ces germes en présence du suc de Citron peut-elle s'expliquer par leur résistance particulière aux ions H^+ ?

La réponse est affirmative pour *B. mesentericus niger* dont les suspensions sont pratiquement peu influencées par l'apport d'acide sulfurique, d'acide citrique et des solutions tampons de MAC ILVAINE et de DAVIS ⁽¹⁾.

Les suspensions de *B. caryocyaneus* ne sont pas non plus précipitées de façon notable par l'acide sulfurique; elles le sont davantage par les solutions tampons de MAC ILVAINE ⁽¹⁾:

Par contre, *B. megatherium* qui n'est pas agglutiné par

(1) Ces faits ont été décrits dans un mémoire publié en 1934, en collaboration avec PH. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR.

le suc de Citron est très sensible à l'action précipitante de l'acide sulfurique et des solutions tampons de MAC ILVAINE (maximum de précipitation vers $\text{pH} = 2,3$ (1)).

En résumé, la similitude qu'on observe entre les courbes de précipitation de *B. chlororaphis* et *B. prodigiosus* par diverses solutions acides et par le suc de Citron permettrait de ramener l'agglutination par le suc de Citron à l'action des ions H^+ . Mais les faits que nous venons de signaler sont en contradiction avec cette hypothèse. Cependant, cette contradiction n'a peut-être pas l'importance qu'au premier abord on peut lui attribuer.

On sait, en effet (NORTHROP, de KRUIF, LASSEUR et ses Collaborateurs) que les ions H^+ n'agissent pas sur les plastides bactériennes en modifiant seulement la charge, mais aussi les forces de cohésion. Or, si plusieurs solutions de même concentration en ions H^+ se comportent de même façon vis-à-vis de la charge électrique, elles n'ont pas toutes la même action sur les forces de cohésion; ici intervient le rôle joué par l'anion lié au cation. Ne venons-nous pas de voir, d'ailleurs, que les suspensions de *B. prodigiosus* qui sont précipitées par plusieurs solutions acides ne sont pas touchées cependant par l'acide sulfurique?

Il ne faut pas négliger non plus le facteur représenté par la pression osmotique, variable suivant la concentration en électrolytes des systèmes. Or, cette concentration est très différente suivant que le système renferme une solution acide, une solution tampon ou du suc de Citron.

Enfin, il est possible que le suc de Citron contienne des substances stabilisantes dont l'action se fasse plus particulièrement sentir sur les suspensions de certaines espèces bactériennes.

En ce qui concerne la précipitation périodique observée avec *B. prodigiosus*, *B. subtilis* (Michigan), *B. subtilis* (Marburg), celle-ci peut très bien trouver une explication dans l'action des ions H^+ . En effet, en présence d'ions positifs, la charge des plastides se trouve abaissée à une certaine valeur critique (de précipitation). S'il reste des ions

(1) Cf. note de la page précédente.

positifs dans le système, la fixation continue, la charge négative s'annule, puis change de signe et augmente; elle peut dépasser la différence de potentiel critique et la suspension est de nouveau stable. Les « vorzone » ont, d'ailleurs, été souvent observées dans la précipitation par les acides.

Si l'agglutination par le suc de Citron est une agglutination acide, la neutralisation du suc devait entraîner la disparition du phénomène.

Dans le cas d'action simultanée d'un anticorps et des ions H^+ , la neutralisation de ceux-ci devait laisser subsister seule la réaction anticorps.

Nous exposons au paragraphe suivant les expériences destinées à confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Action du suc de Citron neutralisé sur les suspensions bactériennes.

On risquait, en neutralisant exactement le suc de Citron au moyen d'une base, de détruire l'anticorps possible. Aussi avons-nous seulement abaissé méthodiquement sa concentration en ions H^+ par apport ménagé de solution tampon. Il fallait également veiller à ne pas modifier la concentration en électrolytes des systèmes afin de ne pas faire intervenir un autre facteur: on connaît, en effet, le rôle des électrolytes dans la précipitation des suspensions bactériennes.

Nous avons donc opéré de la façon suivante. Le suc de Citron est dilué dans l'eau distillée, dans la proportion de 1 partie de suc pour 5,25 parties d'eau distillée. Ce mélange est additionné de son volume de la solution tampon MAC ILVAINE de $pH = 8$. Ce système final est dilué dans l'eau physiologique de façon à fournir les dilutions indiquées au Tableau I.

Le pH des mélanges ainsi additionnés de solution tampon est suffisamment abaissé pour que la précipitation par les ions H^+ ne soit plus possible. La dilution de $1/25$ a un $pH = 6,10$, la dilution $1/1600$ un $pH = 6,47$.

Les mesures de conductibilité effectuées sur ces systèmes montrent que leur concentration en électrolytes est de l'ordre de celle de l'eau physiologique. (Tableau X.)

TABLEAU X
Conductibilité de différents systèmes

Désignation des solutions	Conductibilité spécifique à 25° C.
Suc de Citron non dilué	$K = 5.532 \times 10^{-6}$
Suc de Citron dilué dans l'eau physiologique à 1/200	$K = 17.283 \times 10^{-6}$
Suc de Citron additionné de solution tampon et dilué dans l'eau physiologique à 1/200.	$K = 18.058 \times 10^{-6}$
Eau physiologique	$K = 16.777 \times 10^{-6}$
Solution tampon de MAC ILVAINE de pH = 8	$K = 25.100 \times 10^{-6}$

Le tableau ci-dessous donne les résultats obtenus dans les essais d'agglutination effectués sur différentes Bactéries avec le suc de Citron additionné de solution tampon.

TABLEAU XI
Dilution limite d'agglutination de différentes Bactéries
par le suc de Citron
et le suc de Citron additionné de solution tampon

Espèces bactériennes	Suc de Citron	Suc de Citron additionné de solution tampon de pH = .8
<i>B. balticus</i>	agglutination positive (dilution limite 1/1200)	agglutination négative
<i>B. prodigiosus</i>	agglutination positive (dilution limite 1/1600)	agglutination négative
<i>B. subtilis</i> (Neisser) ..	agglutination positive (dilution limite 1/800)	agglutination négative
<i>B. subtilis</i> (Michigan)	agglutination positive (dilution limite 1/1600)	agglutination négative

On voit qu'un abaissement convenable de l'acidité du suc de Citron fait disparaître complètement son pouvoir agglutinant vis-à-vis des Bactéries expérimentées. Ces faits paraissent démontrer que l'agglutination des Bactéries par le suc de Citron est due à l'action précipitante des ions H^+ .

Cependant, malgré toutes les précautions prises, on pouvait, par l'apport de solution tampon, avoir altéré une agglutinine. Aussi, avant de conclure, nous avons voulu étudier l'influence sur l'agglutination par le suc de Citron de facteurs primordiaux dans les réaction anticorps.

Rôle des électrolytes dans l'agglutination par le suc de Citron.

BORDET (1899) a montré que, dans un système « *sérum agglutinant + germes microbiens* », la présence d'électrolytes est indispensable pour permettre l'agglomération des plastides. D'après les travaux de Ph. LASSEUR (1921), Ph. LASSEUR et A.-M. NOBLAT (1928), Ph. LASSEUR et A. DUPAIX (1932), l'agglutination des germes en présence de sérum homologue n'a lieu que lorsque la concentration en chlorure de sodium est de l'ordre de 200 mmgr. par litre.

De nombreux auteurs ont essayé de préciser le mécanisme par lequel interviennent les électrolytes dans l'agglutination. Pour BORDET, « *le sel déclanche l'agglutination des microbes qui ont tout d'abord fixé l'anticorps* ». Ph. LASSEUR et A.-M. NOBLAT (1928) pensent que les électrolytes interviendraient: 1° à faible dose dans la fixation de l'agglutination sur les plastides; 2° à dose plus élevée pour précipiter les plastides chargées d'agglutinine.

Quoiqu'il en soit du mécanisme d'action des électrolytes dans l'agglutination sérique, il est démontré qu'au dessous d'une certaine teneur des systèmes en électrolytes les plastides ne sont pas agglutinées par un sérum homologue. Il était donc intéressant d'étudier comparativement en pré-

sence et en l'absence d'électrolytes, l'agglutination des Bactéries par le suc de Citron (1).

1° Les suspensions de *B. prodigiosus* effectuées en eau distillée n'agglutinent pas en présence de suc de Citron dilué dans l'eau distillée, tandis qu'elles sont agglutinées en présence d'eau physiologique.

B. subtilis (Neisser) et *B. subtilis* (Michigan) ont des dilutions limites d'agglutination beaucoup plus faibles en eau distillée qu'en eau physiologique. (Tableaux XII et XIII.)

TABLEAU XII

Influence des électrolytes sur l'agglutination de *B. prodigiosus* par le suc de Citron

Dilution du suc de Citron	Aspect de l'agglutination	
	en eau distillée	en eau physiologique
1/25	homogène	homogène
1/50	homogène	homogène
1/100	homogène	homogène
1/200	homogène	fin précipité
1/400	homogène	dépôt, liquide louche
1/500	homogène	dépôt, liquide presque clair
1/600	homogène	dépôt, liquide presque clair
1/800	homogène	dépôt, liquide clair
1/1200	homogène	homogène
1/1600	homogène	homogène
1/3200	homogène	homogène
témoin	homogène	homogène

(1) Pour opérer avec le minimum d'électrolytes, les germes sont lavés trois fois à l'eau distillée et le suc de Citron est dilué dans l'eau distillée. Il est bien évident qu'on ne peut éliminer toute trace d'électrolytes; d'ailleurs, le suc de Citron en apporte une certaine quantité. Cependant, les systèmes réalisés dans de telles conditions sont pratiquement trop pauvres en électrolytes pour permettre la précipitation des plastides en présence d'agglutinine.

TABLEAU XIII

Influence des électrolytes sur la dilution limite d'agglutination de *B. subtilis* par le suc de Citron

Désignation des souches utilisées	Dilution limite d'agglutination	
	en eau distillée	en eau physiologique
<i>B. subtilis</i> (Neisser).....	1/100	> 1/800
<i>B. subtilis</i> (Michigan)	1/100	> 1/800

2° A l'inverse des espèces bactériennes dont l'agglutination est schématisée ci-dessus, *B. subtilis* (Marburg) et *B. chlororaphis* ne sont pas agglutinés dans l'eau physiologique, tandis qu'en eau distillée ces germes sont agglutinés respectivement à la dilution limite de 1/100 et 1/200.

3° Enfin, avec *B. balticus*, la présence ou l'absence d'électrolytes n'influe pas sur la dilution limite d'agglutination.

En résumé, le rôle joué par les électrolytes dans l'agglutination par le suc de Citron ne permet pas de déterminer si l'agglutination est de nature chimique ou due à un anticorps.

Agglutination par le suc de Citron filtré.

Les agglutinines étant fixées à un support protéique on conçoit qu'elles soient peu dialysables et qu'elles puissent être retenues par certains filtres.

Des expériences d'ARLOING et LANGERON (1926) ont montré que la filtration sur bougie Chamberland L, d'un sérum agglutinant à une dilution limite élevée (1/500.000) diminue son activité de façon considérable: de 80 à 99 %. Après quatre passages sur bougie, le sérum expérimenté devient complètement inactif.

Des faits analogues s'observent avec les agglutinines végétales. CARBONE et ARNAUDI, par exemple, font disparaître le pouvoir agglutinant de l'extrait de Laurier-Cerise

et de la sève élaborée du Mûrier par filtration sur bougie Chamberland F.

Nous avons donc consacré des essais à étudier le pouvoir agglutinant du suc de Citron filtré sur bougie Chamberland L.

Le suc ainsi traité est doué de pouvoir agglutinant aussi élevé que le suc non filtré.

Agglutination par le suc de Citron soumis à l'action des températures élevées.

On connaît l'action destructive de la chaleur sur les anticorps animaux.

La température et le temps de chauffage nécessaires à l'inactivation d'un sérum agglutinant varient avec l'agglutinine considérée. L'agglutinine pesteuse, l'agglutinine tuberculeuse seraient détruites à 56° C. (KOLLE et ROMBERG, 1901). Dans les expériences de BORDET (1899), le pouvoir agglutinant du sérum de Chèvre ou de Cobaye immunisé contre le Vibriion cholérique s'affaiblit vers 62° C. Il disparaît presque complètement à 70° C. Suivant PIETTRE et CHRÉTIEN (1928-1929), « *c'est entre 70° et 75°... que le pouvoir agglutinant subit une chute brusque* ». En collaboration avec Ph. LASSEUR et A. DUPAIX-LASSEUR, nous avons montré (1934) que le pouvoir agglutinant du sérum de Lapin anti-*B. chlororaphis* diminue de moitié après 30 minutes de chauffage à 70° C. L'activité de l'agglutinine-*B. pyocyaneus* ne subit une légère baisse qu'après un temps de chauffage de 45 minutes à cette température. Ces deux agglutinines sont affaiblies considérablement à 80° C. et complètement détruites par un séjour de 5 minutes à 91°5 C.

Les substances végétales douées de propriétés agglutinantes normales ou spécifiques sont également sensibles à l'action de la chaleur. Un chauffage à 60° C. durant 15 minutes détruit l'agglutinine de *Solanum* (WAGNER). Le suc des Légumineuses qui agglutine *B. radicola* perd son activité si on le soumet pendant 30 minutes à la température de 78°-80° C. (CAPPELLETTI).

Cependant, les agglutinines végétales résistent souvent à des températures assez élevées. Elles ne sont détruites qu'à l'ébullition dans les expériences de PEETERS, CARBONE et ARNAUDI, MAGROU, etc... Ce fait n'est pas surprenant, car les protéines végétales sont un peu moins sensibles que les protéines animales à l'action de la chaleur.

Afin de nous placer dans les conditions les plus favorables à la disparition du pouvoir agglutinant du suc de Citron par chauffage, nous l'avons chauffé avant toute dilution. La destruction de l'agglutinine est, en effet, dans une certaine mesure, liée à la coagulation de l'albumine et une dilution convenable du liquide albumineux peut empêcher sa coagulation en masse.

Un séjour du suc de Citron durant 30 minutes à la température de 65° C. ne modifie pas la dilution limite d'agglutination de ce suc pour: *B. pyocyaneus*, *B. balticus*, *B. chlororaphis*, *B. subtilis* (Neisser), *B. subtilis* (Michigan).

Le tableau ci-dessous montre que le chauffage du suc de Citron à 80° C. pendant 40 minutes laisse également intact son pouvoir agglutinant.

TABLEAU XIV

Agglutination par le suc de Citron non chauffé
et par le suc de Citron chauffé à 80° C.

Espèces bactériennes utilisées	Dilution limite d'agglutination du suc de Citron	
	non chauffé	chauffé
<i>B. prodigiosus</i> ,	1/1200	1/1200
<i>B. balticus</i>	1/1600	1/1600
<i>B. subtilis</i> (Neisser).....	1/800	1/800
<i>B. subtilis</i> (Michigan)	1/1200	1/1200

Le chauffage ayant déterminé, en général, une légère opalescence du suc de Citron et parfois l'apparition de flocons, nous avons, dans quelques essais, fait suivre le

chauffage de filtration sur bougie Chamberland L₃, destinée à éliminer le précipité.

Les résultats obtenus avec le filtrat sont identiques à ceux que fournit le suc seulement chauffé.

Non seulement le chauffage du suc de Citron ne provoque pas la chute de son pouvoir agglutinant, mais il semble, de plus, augmenter légèrement la vitesse de réaction. On note, en effet, dans les systèmes agglutinants renfermant du suc chauffé une sédimentation des corps microbiens plus complète qu'avec le suc non chauffé. Ce fait est peut-être dû à la coagulation d'une substance stabilisante, une albumine, par exemple (coagulation qui se manifeste par l'opalescence du suc chauffé (1)).

Réaction de CASTELLANI.

L'action nulle du chauffage et de la filtration sur l'agglutination par le suc de Citron ne plaide pas en faveur de l'hypothèse d'une agglutinine végétale. Mais le rôle joué par les électrolytes n'infirmes ni ne confirme nettement cette hypothèse.

En présence de ces résultats un peu contradictoires, nous avons effectué sur le suc de Citron la réaction de CASTELLANI ou de « saturation des agglutinines ».

On sait qu'il est possible, au moyen de cette réaction, de dépouiller un sérum de ses agglutinines. Appliquée au suc de Citron, la réaction de CASTELLANI devait permettre, s'il existait une agglutinine végétale, de la fixer et de faire disparaître le pouvoir agglutinant du suc (ou tout au moins de le diminuer en ne laissant persister que la précipitation acide).

La réaction de CASTELLANI est réalisée de la façon suivante. Les germes microbiens provenant de culture sur gélose peptone sont lavés trois fois à l'eau physiologique, agités avec

(1) Ce phénomène est l'inverse de celui que décrit Visco. Dans les expériences de cet auteur, en effet, le suc de Citron chauffé pendant 30 minutes à 60° C., est dénué de pouvoir agglutinant; de plus, en présence de suc chauffé, une solution d'acide citrique est incapable de précipiter les plastides bactériennes: le chauffage aurait provoqué la formation de substances stabilisantes.

des billes de verre et soumis à une centrifugation fractionnée. La suspension décantée est diluée de façon à fournir un système renfermant environ 100 milliards de germes au cm^3 .

Cette suspension-mère est additionnée d'une partie de suc de Citron préalablement dilué à 1/6,25; la dilution finale du suc est donc de 1/12,5.

Le mélange ainsi préparé est placé à l'étuve à 37° C. Après 30 minutes, il est centrifugé jusqu'à l'obtention d'un liquide clair.

Le liquide clair décanté qui constitue le suc de Citron « saturé », est dilué suivant le schéma du tableau I, et mis en présence des plastides de l'espèce bactérienne ayant servi à la saturation du suc.

Nous indiquons ci-dessous la dilution limite d'agglutination, obtenue dans la réaction de CASTELLANI avec *B. prodigiosus*, *B. balticus*, *B. subtilis* (Neisser), *B. subtilis* (Michigan).

TABLEAU XV
Réaction de CASTELLANI

Composition du système agglutinant	Dilution limite d'agglutination du suc de Citron « saturé » ou non mis en présence de			
	<i>B. subtilis</i> (Michigan)	<i>B. subtilis</i> (NEISSER)	<i>B. balticus</i>	<i>B. prodigiosus</i>
Suc de Citron non « saturé »	1/1200	1/600	1/1200	1/800
Suc de Citron mis au contact de <i>B. subtilis</i> (Michigan)	1/1200			
Suc de Citron mis au contact de <i>B. subtilis</i> (Neisser)		1/400		
Suc de Citron mis au contact de <i>B. balticus</i>			1/800	
Suc de Citron mis au contact de <i>B. prodigiosus</i>				1/400

On constate, dans ces essais, que le contact du suc de Citron avec des corps microbiens de *B. subtilis* (Michigan) n'abaisse pas son pouvoir agglutinant vis-à-vis de *B. subtilis* (Michigan) : la dilution limite est la même que celle du suc non « saturé » ; de plus, la sédimentation est aussi intense et il persiste également un optimum de précipitation.

Par contre, le suc de Citron « saturé » par les corps microbiens de *B. subtilis* (Neisser), *B. balticus* ou *B. prodigiosus* agglutine l'espèce correspondante à une dilution limite plus faible que le suc non « saturé ».

Interprétation de ces faits.

1° Il faut noter d'abord que la chute du pouvoir agglutinant est assez faible. Le contact d'un liquide moyennement actif avec une suspension bactérienne aussi riche en germes que celle que nous avons employée aurait dû normalement le priver de la presque totalité de ses agglutinines.

2° Le contact du suc de Citron avec une grande quantité de corps microbiens a pu modifier sa concentration en ions H^+ , car, d'une part, les suspensions bactériennes même lavées contiennent encore des électrolytes, d'autre part, les plastides fixent des ions H^+ .

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé la valeur du pH du suc de Citron avant et après contact avec les corps microbiens de chacune des espèces utilisées.

A titre d'exemple, nous donnons dans le tableau ci-dessous les variations du pH du suc de Citron « saturé » par *B. subtilis* (Michigan), d'une part, par *B. prodigiosus*, d'autre part.

TABEAU

TABLEAU XVI

Variation du pH du suc de Citron
mis au contact de corps microbiens de *B. subtilis* (Michigan)
et de *B. prodigiosus*.

Dilution du suc de Citron	pH du suc de Citron n'ayant pas été au contact de corps microbiens		pH du suc de Citron ayant été au contact de corps microbiens de	
	essais effectués avec			
	<i>B. subtilis</i> (Michigan)	<i>B. prodigiosus</i>	<i>B. subtilis</i> (Michigan)	<i>B. prodigiosus</i>
1/12,5	2,77		2,77	
1/25		2,58		3,22
1/100	3,09	3,00	3,07	3,37
1/200	3,21	3,23	3,22	4,36
1/400		3,90		4,49
1/800		4,40		4,68

L'examen de ce tableau montre que le contact du suc de Citron avec *B. subtilis* (Michigan) ne fait pas varier son pH ou ne le fait varier que de façon insignifiante; or, la dilution limite d'agglutination de ce suc pour *B. subtilis* (Michigan) est la même que celle que donne le suc non « saturé ».

Au contraire, l'acidité du suc « saturé » par *B. prodigiosus* a notablement diminué: à la dilution de 1/25, le pH passe de 2,58 à 3,22. La dilution de 1/400 du suc « saturé » a un pH de 4,49, pH très voisin de celui qu'offre la dilution de 1/800 du suc non « saturé »: pH = 4,40. Or, dans la réaction de CASTELLANI, la dilution limite d'agglutination de *B. prodigiosus* est précisément passée de 1/800 à 1/400.

De même, dans les essais effectués avec *B. balticus*, la dilution limite d'agglutination correspond à une diminution de l'acidité du suc: le pH de la dilution 1/12,5 du suc passe de 2,48 à 2,68.

L'abaissement du pouvoir agglutinant du suc de Citron soumis à l'épreuve de saturation des agglutinines n'est donc pas dû à la fixation d'un anticorps par les corps microbiens, mais à la fixation d'ions H^+ , se traduisant par un déplacement du pH du côté alcalin.

Si nous résumons l'ensemble des faits observés dans l'agglutination de différentes Bactéries par le suc de Citron, nous voyons que les essais effectués en présence ou en l'absence d'électrolytes ne permettent pas d'interpréter le phénomène.

Par contre:

1° Le parallélisme qui s'observe entre l'agglutination des plastides par le suc végétal et leur précipitation par différentes solutions acides;

2° La disparition du pouvoir agglutinant du suc de Citron après abaissement convenable de son pH;

3° La résistance du pouvoir agglutinant au chauffage et à la filtration;

4° La réaction de CASTELLANI nous autorisent à conclure que, dans nos conditions d'expérience, le suc de Citron ne renferme pas d'agglutinines normales et que ses propriétés agglutinantes sont dues à sa concentration élevée en ions H^+ .

CHAPITRE II

Recherche d'agglutinines spécifiques chez quelques Végétaux

Généralités

Parmi les faits décrits dans la littérature, concernant les anticorps spécifiques élaborés par l'organisme végétal, quelques-uns seulement démontrent la formation d'agglutinines. Rappelons brièvement (nous les avons analysés plus haut) les mieux établis de ceux-ci.

Les agglutinines spécifiques de *B. radicola* ont été trouvées par CAPPELLETTI dans le suc des Légumineuses. PICADO a réussi à provoquer la formation de « *pollenoagglutinines* » chez *Opuntia*. MAGROU a montré que le suc de *Pelargonium* et de *Chrysanthemum* atteints de tumeurs ont vis-à-vis de *Bact. tumefaciens* une action agglutinante différente de celle du suc de plants non inoculés.

Par contre, SARDINA, A. DUPAIX n'ont pu agglutiner les Bactéries homologues par le suc d'*Opuntia*. SARDINA, RIKER, ARNAUDI, GHEORGHIOU n'ont pas décelé d'agglutinines de *Bact. tumefaciens* chez les plantes inoculées.

Devant la divergence de ces résultats, nous avons, à notre tour, tenté de provoquer la formation d'agglutinines chez quelques Végétaux par l'inoculation de différentes Bactéries.

Technique

Choix du matériel bactérien.

Plusieurs expérimentateurs ont employé pour la démonstration des agglutinines végétales des Bactéries pathogènes pour l'Homme et les Animaux, très agglutinogènes et facilement agglutinables. Or, il n'est pas évident, *a priori*, qu'une Bactérie douée de pouvoir antigène élevé vis-à-vis de l'Animal détermine la production d'agglutinines chez la plante, la complexité de l'organisme végétal étant beaucoup moindre que celle de l'organisme animal. Il semble plus logique d'utiliser des Bactéries dites saprophytes, dont quelques-unes possèdent un pouvoir agglutinogène aussi élevé que les Bactéries hautement pathogènes, ou des Bactéries spécialement phytopathogènes.

Nous avons donc employé pour nos inoculations: *B. prodigiosus* ⁽¹⁾, *B. mori*, *Bact. tumefaciens*.

Choix des Végétaux.

Les espèces végétales qui paraissent le mieux adaptées à ce genre de recherches sont celles qui 1° possèdent des tissus assez élastiques facilitant l'introduction d'un volume suffisant de liquide antigène; 2° fournissent une grande quantité de suc qui permet de multiplier les recherches pour arriver à la plus grande précision possible dans les résultats.

D'autre part, si l'on inocule une Bactérie phytopathogène, il y a intérêt à choisir l'espèce végétale sensible à cette Bactérie.

Malheureusement, sous le climat de l'Est, le nombre de plantes répondant à ces diverses conditions est assez limité. Pour l'inoculation de *B. mori* et de *B. prodigiosus* nous

(1) La coloration rouge de cette Bactérie devait faciliter sa recherche dans le Végétal inoculé.

avons choisi *Begonia* ⁽¹⁾. La souche de *Bact. tumefaciens* utilisée étant particulièrement pathogène pour *Anthemis*, nous l'avons inoculée à *Anthemis frutescens* ⁽¹⁾, et, de plus, à *Clivia miniata* ⁽¹⁾.

Milieu de culture et préparation des suspensions (2).

Les Bactéries sont cultivées sur gélose peptone de pH = 7. Après 40 heures de culture à la température du laboratoire. les corps microbiens sont mis en suspension et lavés à l'eau distillée ou physiologique suivant les essais. On effectue un seul lavage des germes destinés à l'inoculation, et trois lavages des germes destinés aux essais d'agglutination. La suspension rendue homogène par agitation avec des billes de verre et centrifugation fractionnée est amenée à une concentration convenable: 8 milliards de germes au cm³ pour les suspensions devant servir à la recherche de la dilution limite d'agglutination; 16 milliards pour les suspensions dont on veut mesurer le trouble, à l'aide du néphéloabsorptiomètre ⁽³⁾; 60 milliards pour les suspensions à inoculer.

Inoculations.

Les inoculations sont effectuées au moyen d'une seringue munie d'aiguille très fine, soit dans les tiges ou pétioles de feuilles (*Begonia*), soit dans les tiges seulement (*Anthemis*), soit encore dans les feuilles et hampes florales (*Clivia*). Le volume de suspension bactérienne pouvant être introduit par ce procédé est plus grand avec *Begonia* et *Clivia* dont les tissus sont assez élastiques qu'avec *Anthemis* qui a des tiges très lignifiées. Il reste, cependant, en général, assez faible. Pour pallier à cet inconvénient, chaque inoculation est réa-

(1) Nous nous sommes procurée ces plantes grâce à l'aimable obligeance de Monsieur LAISNÉ, ingénieur horticole, Directeur des Promenades de la Ville de Nancy. Qu'il veuille bien recevoir ici l'expression de notre vive gratitude.

(2) Ces points de technique ont été décrits avec plus de détails au chapitre précédent.

(3) L'expérience nous a montré que cette concentration en germes est celle qui permet d'effectuer les meilleures mesures d'absorption.

lisée au moyen, non pas d'une seule, mais de plusieurs piqûres, en différents points de la plante; de plus, on utilise, comme nous venons de le voir, une suspension extrêmement riche en corps microbiens. La quantité d'antigène absorbée par la plante paraît ainsi suffisante.

Des 30 plants de *Begonia* en expérience, 5 ont été inoculés avec *B. mori*, 5 avec *B. prodigiosus*. Chaque plant a été soumis à 3 séries d'inoculations, espacées de plusieurs semaines.

Anthemis et *Clivia* ont reçu 5 injections de *Bact. tumefaciens*, effectuées tous les quinze jours.

La partie aérienne des plantes inoculées et des plantes non inoculées a été récoltée 25 jours après la dernière inoculation dans le cas de *Begonia*, 10 jours seulement dans le cas d'*Anthemis* et de *Clivia*.

Obtention du suc.

L'extraction du suc des plantes a été réalisée en découpant les tiges et feuilles (1) en petits fragments qui ont été ensuite soumis à la pression.

L'emploi d'une presse à main nous a permis d'obtenir avec *Begonia* une quantité de liquide assez grande. Pour *Anthemis* et *Clivia* nous avons eu recours à une presse hydraulique de 10 tonnes (2).

Les sucs de pression extrêmement troubles, ont été clarifiés par centrifugation à 12.000 tours, pendant 10 à 20 minutes. Les liquides décantés, suffisamment limpides pour être utilisés tels quels dans les essais d'agglutination étaient malheureusement envahis très rapidement par les microorganismes. Aussi, nos essais destinés à préciser la nature du phénomène étudié, ne pouvant tous être effectués le même jour,

(1) Nous verrons que le suc de *Clivia* n'a pas été extrait de toute la partie aérienne, mais seulement de régions déterminées.

(2) L'installation du Laboratoire de Matière médicale avait été très aimablement mise à notre disposition par Monsieur le Doyen GILLOT. Nous comptons lui en exprimer ici toute notre reconnaissance. Nous ne pouvons que nous incliner très respectueusement devant sa mémoire.

nous avons dû envisager un procédé de conservation des suc végétaux, qui modifiât aussi peu que possible leurs propriétés. La filtration nous a paru être le meilleur. Après centrifugation, les suc ont donc été filtrés sur bougie Chamberland L2; puis, cette filtration s'étant montrée insuffisante, nous avons employé les bougies L 3. Les suc filtrés ont été répartis en ampoules, scellées ensuite à la flamme.

Cependant, nous n'avons pas soumis à la filtration la totalité des suc centrifugés. Nous en avons réservé une certaine quantité qui a été utilisée pour des expériences préliminaires destinées à vérifier que la filtration n'avait pas altéré les propriétés agglutinantes des suc.

Protocole d'expérience.

L'expérimentation comportait, en général:

- 1° La recherche de la dilution limite d'agglutination;
- 2° L'évaluation du trouble des suspensions.

La technique utilisée pour ces deux sortes d'essais ayant été décrite dans l'étude de l'agglutination par le suc de Citron, nous donnons seulement ici le protocole de dilutions utilisé.

TABLEAU XVII
Protocole d'expérience.

Désignation des systèmes	Composition des systèmes agglutinants	Dilution finale du suc de <i>Begonia</i> dans les systèmes
a	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/5	1/10
b	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/10	1/20
c	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/20	1/40
d	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/25	1/50
e	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/50	1/100
f	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/100	1/200
g	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ suc de <i>Begonia</i> dilué à 1/200	1/400
témoin	1 cm ³ suspension + 1 cm ³ eau physiologique	

Mesure du trouble.

Le trouble des systèmes a été mesuré au moyen du néphéloabsorptiomètre de Kipp, appareil que nous avons décrit plus haut (page 70).

Détermination du pH et de la conductibilité.

Nous avons eu à effectuer des mesures de pH, et à déterminer, par des mesures de conductibilité, la concentration en électrolytes de certains systèmes. Pour la technique concernant ces diverses mesures le Lecteur voudra bien se reporter au chapitre précédent.

Résultats expérimentaux

1) ESSAIS EFFECTUÉS AVEC *Begonia*.

Aspect des plantes inoculées.

L'inoculation à *Begonia* de *B. prodigiosus*, d'une part, de *B. mori*, d'autre part, ne détermine que des lésions banales, dues à la piquûre, qui se cicatrisent rapidement. L'aspect général des plantes inoculées n'est pas sensiblement modifié. Elles continuent à croître, et fleurissent comme les témoins, pendant toute la période des inoculations qui s'étend de juillet à octobre.

Nous avons voulu nous rendre compte si l'absorption des antigènes avait été réalisée par l'organisme végétal entier. A cet effet, nous avons prélevé aseptiquement, à l'aide d'une pipette fine, quelques centimètres cubes de suc dans la tige d'une des plantes inoculées avec *B. prodigiosus*, ceci 25 jours après la dernière inoculation. L'ensemencement de ce suc sur pomme de terre glycinée nous a donné une belle culture de coloration rouge, caractéristique de *B. prodigiosus*. Ce fait prouve, sans conteste, que *B. prodigiosus* avait envahi la plante entière et qu'il avait pu s'y développer. Il semblait

donc que nous étions dans des conditions très favorables à l'élaboration d'un anticorps végétal.

Dilution limite d'agglutination.

Les essais d'agglutination sont effectués parallèlement avec le suc de *Begonia* non inoculé et le suc de *Begonia* inoculé.

L'expérience montre que *B. prodigiosus*, d'une part, *B. mori*, d'autre part sont agglutinés à la même dilution limite par le suc des plantes non préparées et par le suc des plantes préparées avec l'un et l'autre germe.

De plus, une Bactérie hétérologue, *B. subtilis* (Marburg) est agglutinée par ces différents suc à une dilution limite aussi élevée que les germes homologues. Le tableau ci-dessous schématise ces résultats.

TABLEAU XVIII

Désignation des espèces bactériennes	Dilution limite d'agglutination du suc de <i>Begonia</i>		
	non inoculé	inoculé avec <i>B. prodigiosus</i>	inoculé avec <i>B. mori</i>
<i>B. mori</i>	1/50	1/50	1/50
<i>B. prodigiosus</i>	1/200	1/200	1/200
<i>B. subtilis</i> (Marburg) . . .	1/50	1/50	1/50

Aspect de l'agglutination.

Pour un germe donné, les systèmes agglutinants présentent sensiblement le même aspect, qu'ils comportent du suc de plante non préparée, préparée avec le germe homologue ou préparée avec un germe hétérologue.

Avec *B. mori* et *B. subtilis* (Marburg), l'intensité de l'agglutination décroît régulièrement avec la dilution croissante du suc.

Dans l'agglutination de *B. prodigiosus*, au contraire, on

observe le « phénomène paradoxal », comme on peut le constater par la lecture du tableau XIX.

TABLEAU XIX

Agglutination de *B. prodigiosus* par le suc de *Begonia*

Dilution du suc de <i>Begonia</i>	Aspect des systèmes agglutinants
1/10	dépôt, liquide trouble
1/20	dépôt, liquide trouble
1/40	dépôt, liquide trouble
1/50	dépôt, liquide à peine louche (1)
1/100	dépôt, liquide trouble
1/200	homogène
1/400	homogène
témoin	homogène

(1) Maximum de précipitation.

Nous venons de voir que l'inoculation d'une Bactérie à *Begonia* n'augmente pas le pouvoir agglutinant de son suc à l'égard de cette Bactérie.

Il nous reste à déterminer si ce pouvoir agglutinant est imputable à des ions H^+ ou à une agglutinine « normale ». Nous sommes amenés, par conséquent, à mesurer le pH du suc de *Begonia* et à étudier comment varie ce pH avec la dilution du suc.

pH du suc de Begonia.

Le suc de *Begonia* non inoculé (suc centrifugé et filtré) offre un pH de l'ordre de 2,45 - 2,52. La préparation des plantes n'a pas modifié sensiblement cette acidité, car les mesures effectuées sur le suc des plants inoculés avec *B. mori* ou avec *B. prodigiosus* donnent un pH de 2,46 - 2,50.

Ci-dessous, nous indiquons le pH des différentes dilutions

de suc de *Begonia* (inoculé et non inoculé), additionnées de partie égale de suspension bactérienne.

TABEAU XX

Dilution du suc de <i>Begonia</i> dans le système	pH des systèmes comportant une partie de suspension bactérienne + une partie de suc de <i>Begonia</i>		
	non inoculé	inoculé avec <i>B. prodigiosus</i>	inoculé avec <i>B. mori</i>
1/10	3,27	3,20	3,22
1/20	3,72	3,63	
1/40	3,80	3,80	3,80
1/50	3,99	4,01	4,01
1/100	4,23	4,18	4,23
1/200	4,54	4,25	
1/400	5,11		

On voit qu'à la dilution de 1/50, maximum de précipitation de *B. prodigiosus*, le suc de *Begonia*, normal ou préparé possède un pH de l'ordre de pH = 4,00. Or, nous avons montré, au chapitre précédent, que, si les suspensions de *B. prodigiosus* précipitent par l'acide chlorhydrique et l'acide citrique à un pH de l'ordre de 2,50, leur précipitation avec les solutions tampons de DAVIS et avec le suc de Citron se produit à un pH moins acide: maximum vers pH = 3,90. Ce fait coïncide avec l'existence d'une « vorzone », dans la zone des pH acides, « vorzone » que nous retrouvons dans l'agglutination de *B. prodigiosus* par le suc de *Begonia*.

Il semble donc possible que l'agglutination par le suc de *Begonia* normal ou préparé soit due à l'action des ions H⁺. Par conséquent, la diminution de la concentration en ions H⁺ du suc entraînerait la disparition de son pouvoir agglutinant.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé les expériences suivantes.

Abaissement de la concentration en ions H⁺ du suc de Begonia.

La concentration en ions H⁺ du suc de *Begonia* non inoculé ou inoculé est abaissée en ajoutant à 4 parties de suc dilué à 1/4 (soit dans l'eau distillée, soit dans l'eau physiologique), 1 partie de solution tampon de MAC ILVAINE de pH = 8. Ce mélange (dilution 1/5 du suc) est dilué suivant le protocole indiqué précédemment.

Le pH du suc est ainsi amené à pH = 6,57, pour la dilution 1/10, à pH = 6,90 pour la dilution 1/100.

En présence des systèmes : suc de *Begonia* non inoculé additionné de solution tampon ou suc de *Begonia* inoculé additionné de solution tampon, les suspensions de *B. prodigiosus* restent parfaitement homogènes.

Le tableau ci-dessous donne comparativement l'aspect et l'opacité des systèmes dans l'agglutination de *B. prodigiosus* par le suc de *Begonia* inoculé, d'une part, par le suc de *Begonia* inoculé et additionné de solution tampon, d'autre part.

TABLEAU XXI

Dilution du suc de <i>Begonia</i> dans le système	Agglutination de <i>B. prodigiosus</i>			
	par le suc de <i>Begonia</i>		par le suc de <i>Begonia</i> inoculé additionné de solution tampon	
	aspect des systèmes	mesures (1) du trouble	aspect des systèmes	mesures (1) du trouble
1/10	dépôt, liquide louche	45,5	homogène	72 (2)
1/20	dépôt, liquide moins louche	37,5	homogène	72
1/40	dépôt, liquide louche	44,5	homogène	70
1/50	dépôt, liquide louche	36	homogène	70
1/100	dépôt, liquide louche	58	homogène	70
1/200	homogène	71	homogène	70
témoin	homogène	70	homogène	70

(1) Mesures fournies par le néphéloabsorptiomètre de Kipp.

(2) Les légères différences d'opacité qui s'observent entre plusieurs systèmes également homogènes tiennent aux erreurs dans les mesures effectuées à la pipette, lors de la préparation des mélanges.

Dans les essais que schématise ce tableau, les dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique. D'autre essais où les systèmes additionnés de solution tampon sont dilués dans l'eau distillée apportent des résultats identiques.

On pouvait craindre que l'addition de solution tampon au suc de *Begonia* n'ait déterminé une concentration en électrolytes telle que n'ait pu se produire l'agglomération des plastides, même chargées d'agglutinine. Afin de nous rendre compte si cette hypothèse était exacte, nous avons effectué des mesures de conductibilité sur les mélanges « *suspension bactérienne + suc additionné de solution tampon* », réalisés soit en eau distillée, soit en eau physiologique. Le tableau suivant indique quelques-unes des valeurs observées.

TABLEAU XXII

Conductibilité de quelques systèmes
renfermant parties égales de suspension bactérienne
et de suc de *Begonia* non neutralisé ou neutralisé

Désignation des systèmes	Conductibilité spécifique à 25° C.
Eau physiologique	$K = 16.777 \times 10^{-6}$
Suc de <i>Begonia</i> dilué dans { l'eau physiologique {	$\left. \begin{array}{l} \text{dilution } 1/10 \quad K = 13.360 \times 10^{-6} \\ \text{dilution } 1/100 \quad K = 13.850 \times 10^{-6} \end{array} \right\}$
Suc de <i>Begonia</i> additionné { de solution tampon et dilué { dans l'eau physiologique. . {	$\left. \begin{array}{l} \text{dilution } 1/10 \quad K = 13.680 \times 10^{-6} \\ \text{dilution } 1/100 \quad K = 19.960 \times 10^{-6} \end{array} \right\}$
Suc de <i>Begonia</i> additionné { de solution tampon et dilué { dans l'eau distillée {	$\left. \begin{array}{l} \text{dilution } 1/10 \quad K = 4.067 \times 10^{-6} \\ \text{dilution } 1/100 \quad K = 566 \times 10^{-6} \end{array} \right\}$

On voit par les nombres ci-dessus que les mélanges neutralisés (ou, plus exactement amenés à un pH de l'ordre de pH = 6,5) ont une concentration faible en électrolytes, peu favorable à l'agglutination, s'ils sont effectués dans l'eau distillée. Par contre, les systèmes de même pH dilués dans

l'eau physiologique, ont une conductibilité voisine de celle de l'eau physiologique. Or, nous avons vu que la disparition du pouvoir agglutinant est totale dans ces derniers.

La suppression des propriétés agglutinantes du suc de *Begonia* par abaissement de sa concentration en ions H^+ n'est pas imputable à une concentration en électrolytes défavorable à l'agglutination. Elle n'est pas due non plus à une stabilisation de la suspension bactérienne par les ions OH^- , puisque nous avons pris soin de laisser au suc un pH faiblement acide. Par conséquent, le pouvoir agglutinant du suc de *Begonia* non inoculé ou inoculé paraît bien dû à sa concentration élevée en ions H^+ .

Cependant, comme on peut objecter que l'apport de solution tampon a peut-être modifié profondément le suc végétal et précipité le complexe anticorps, nous avons voulu mettre, si possible, cet anticorps en évidence au moyen de la réaction de saturation des agglutinines de CASTELLANI.

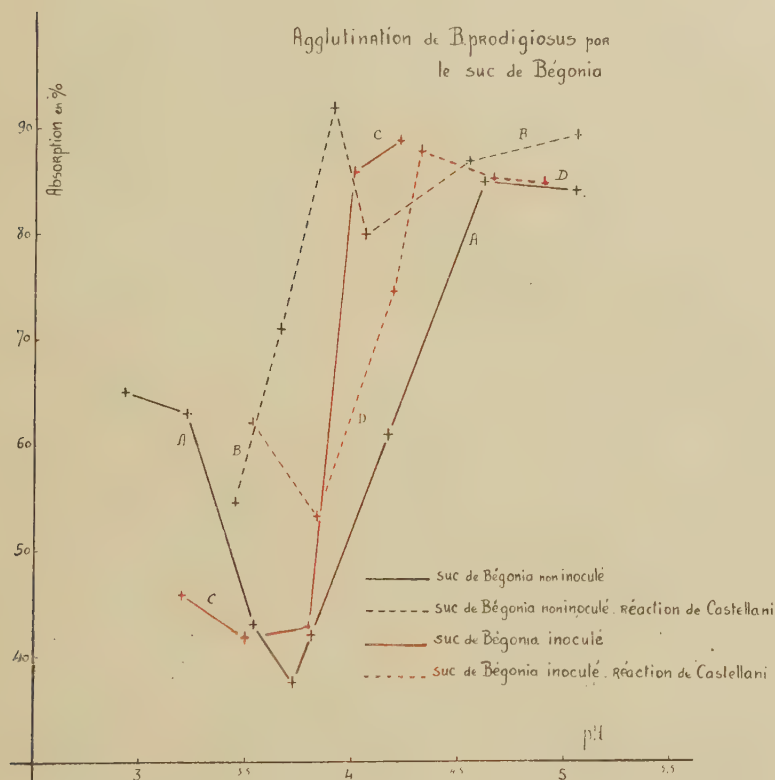
Réaction de CASTELLANI.

La réaction de CASTELLANI est réalisée comme suit. On ajoute à 1 partie de suc (de *Begonia* normal ou préparé), dilué à 1/2,5, une partie de suspension très riche en corps microbiens de *B. prodigiosus* (100 milliards de germes au cm^3). Après séjour de 30 minutes à l'étuve à $37^\circ C$. le mélange est centrifugé. Le liquide clair décanté (dilution 1/5 du suc) est dilué jusqu'à 1/100; chaque dilution est additionnée de partie égale de suspension de *B. prodigiosus* (de concentration en germes égale à 8 milliards au cm^3).

Les essais sont effectués parallèlement: 1° avec le suc de *Begonia* non inoculé et le suc de *Begonia* inoculé « saturé », d'une part; 2° avec le suc de *Begonia* inoculé et le suc de *Begonia* inoculé « saturé », d'autre part.

Les résultats obtenus sont schématisés dans la figure ci-dessous qui représente la précipitation des suspensions de *B. prodigiosus* par les différents sucs en fonction du pH des

systèmes. Les nombres qui figurent en ordonnées sont fournis par le néphéloabsorptiomètre de Kipp.



1° Suc de *Begonia* non inoculé.

L'examen de la figure montre que le contact préalable du suc de *Begonia* non inoculé avec les corps microbiens de *B. prodigiosus* détermine un abaissement de pouvoir agglutinant qui coïncide avec une diminution de son acidité. A la dilution de 1/10, le pH du suc non « saturé » est de 1,93, tandis que le pH du suc « saturé » est de 3,46. A cette dilution du suc « saturé », l'intensité du trouble figure par

un point très voisin de celui que donne le suc non « saturé » à $\text{pH} = 3,46$.

Par contre, de la dilution 1/20 ($\text{pH} = 3,66$) à la dilution 1/40 ($\text{pH} = 3,91$), on observe une diminution d'intensité de l'agglutination qui se traduit par un sommet très accentué de la courbe: ainsi, dans cette zone, la courbe de précipitation par le suc de *Begonia* ayant été au contact de corps microbiens n'offre plus de parallélisme avec la courbe d'agglutination par le suc non « saturé ». Mais, il ne faut pas oublier que l'agglutination naissante se traduit par une augmentation d'opacité: c'est probablement à ce fait qu'il faut attribuer le maximum de trouble présenté par les suspensions additionnées de suc de *Begonia* saturé, à la dilution 1/40.

Pour le suc de *Begonia* inoculé, le contact avec des corps microbiens de *B. prodigiosus* entraîne également une chute de pouvoir agglutinant, en même temps qu'une diminution de la concentration en ions H^+ . Les courbes de précipitation par le suc de *Begonia* inoculé et le suc de *Begonia* inoculé « saturé » présentent un parallélisme assez net.

La diminution du pouvoir agglutinant du suc de *Begonia* normal et préparé par la réaction de CASTELLANI doit être vraisemblablement attribuée à la fixation d'une certaine quantité d'ions H^+ par les corps microbiens.

Nous pouvons résumer de la façon suivante les faits décrits dans l'exposé de l'agglutination bactérienne par le suc de *Begonia*.

1° Le suc de *Begonia* non préparé jouit de pouvoir agglutinant vis-à-vis des Bactéries expérimentées.

2° L'inoculation de *B. mori* ou de *B. prodigiosus* à *Begonia* n'augmente pas le pouvoir agglutinant de son suc à l'égard de ces Bactéries.

3° Le suc de *Begonia* préparé agglutine donc les germes hétérologues à des dilutions limites aussi élevées que les germes homologues.

4° Le suc de *Begonia* est acide: les systèmes agglutinants

formés d'une partie de suspension bactérienne et d'une partie de suc de *Begonia* dilué offrent un pH de l'ordre de 2,93 (dilution 1/10) à 3,84 - 4,17 (dilution 1/100).

5° L'abaissement jusqu'à une certaine limite de la concentration en ions H^+ du suc de *Begonia* inoculé ou non inoculé fait disparaître son pouvoir agglutinant.

6° La réaction de saturation des agglutinines appliquée au suc de *Begonia* abaisse son pouvoir agglutinant dans la limite où elle diminue sa concentration en ions H^+ .

Objections.

1° Nos expériences étant effectuées avec du suc filtré sur bougie de porcelaine, l'agglutinine végétale a pu être retenue au cours de la filtration.

Pour répondre à cette objection, nous avons pris soin, comme nous le faisons remarquer au début de ce chapitre, d'effectuer des expériences préliminaires sur du suc non filtré: or, ce suc ne s'est pas montré doué d'un pouvoir agglutinant supérieur à celui du suc filtré.

2° L'absence d'agglutinines dans le suc des plantes préparées peut tenir à deux faits: a) pouvoir agglutinogène nul chez la Bactérie inoculée; b) absorption imparfaite de l'antigène par l'organisme végétal.

Il n'en est rien car 1° nous savons que le sérum d'un Lapin inoculé avec *B. prodigiosus* agglutine ce germe à une dilution limite élevée; 2° nous avons pu isoler *B. prodigiosus* des plants de *Begonia*, 25 jours après la dernière inoculation.

2) ESSAIS EFFECTUÉS AVEC *Anthemis* ET *Clivia*

Mise en évidence du pouvoir agglutinogène et de l'agglutinabilité de la souche de Bact. tumefaciens inoculée à Anthemis et Clivia.

Pour que le sérum d'un animal préparé agglutine la Bactérie homologue, il faut que celle-ci soit: 1° agglutino-

gène; 2° agglutinable, afin de permettre par l'agglomération de ses suspensions la mise en évidence des agglutinines élaborées. Aussi, avant d'inoculer *Bact. tumefaciens* à *Anthemis* et *Clivia*, nous avons voulu, par inoculation à des Lapins nous assurer que notre souche bactérienne possède les deux qualités ci-dessus.

Les Lapins préparés ont reçu 9 injections de corps microbiens de *Bact. tumefaciens*, espacées de 4 à 5 jours. Les 6 premières inoculations ont été effectuées avec des germes tués par la chaleur, à des doses croissantes (de 1 cm³ à 8 cm³), et introduits par voie sous-cutanée, puis intrapéritonéale, puis intraveineuse. Pour les 3 dernières inoculations, nous avons utilisé des germes vivants qui ont été injectés à la dose de 2 cm³ par voie intrapéritonéale, puis intraveineuse.

Les Lapins ont été saignés 6 jours après la dernière inoculation.

Le sérum des Lapins ainsi préparés agglutine *Bact. tumefaciens* à la dilution limite de 1/2000.

La souche de *Bact. tumefaciens* inoculée aux plantes est donc bien agglutinogène et agglutinable.

Aspect des plantes inoculées.

Les lésions légères dues aux piqûres se cicatrisent rapidement, mais chez *Clivia* des indurations apparaissent autour de plusieurs points d'inoculation de *Bact. tumefaciens*. Ces indurations atteignent parfois plusieurs centimètres.

Essais d'agglutination.

1° Suc de *Clivia*.

a) Une première série d'essais est effectuée avec le suc obtenu par pression non de la plante entière, mais seulement des régions de feuilles et hampes florales voisines des points d'inoculation. Le liquide est centrifugé et employé immédiatement, ou, après centrifugation, filtré sur bougie Chamberland L₈.

Les suspensions de *Bact. tumefaciens* en eau physiologi-

que, mises en présence de ces sucs (centrifugé ou centrifugé et filtré), dilués dans l'eau physiologique, restent parfaitement homogènes.

On n'observe pas non plus l'agglutination de germes hétérologues: *B. prodigiosus* et *B. pyocyaneus*.

b) Certains auteurs estiment que, dans le cas d'une infection localisée, la production des anticorps par l'organisme végétal se limite strictement à la région atteinte (1). S'il en était ainsi pour les plantes inoculées avec *Bact. tumefaciens*, nous aurions, dans nos essais précédents, dilué le suc actif avec le suc inactif des parties saines, d'où notre échec.

Nous avons donc, dans une deuxième série d'essais, découpé et soumis à la pression les parties de feuilles correspondant strictement aux indurations. Nous avons ainsi obtenu quelques centimètres cubes de suc qui, centrifugé, donnait un liquide assez clair, et était utilisé immédiatement.

Les suspensions de *Bact. tumefaciens* n'ont pas été agglutinées par ce suc.

c) La pression ayant l'inconvénient de fournir un mélange de liquides qui ne sont pas en contact chez le Végétal, nous avons essayé de recourir à un procédé moins brutal pour l'extraction du suc. À l'aide d'une pipette très effilée, nous avons prélevé quelques centimètres cubes de suc à l'intérieur des régions indurées.

Ce suc s'est montré également dépourvu de propriétés agglutinantes vis-à-vis de *Bact. tumefaciens*.

2° Suc d'*Anthemis*.

Les essais effectués avec le suc d'*Anthemis* non inoculé ou inoculé ne nous ont permis d'observer, dans aucun cas, l'agglutination de *Bact. tumefaciens*.

(1) Les agglutinines anti-*B. radicola* des Légumineuses seraient, d'après CAPPELLETTI, rigoureusement localisées aux cellules infectées. Par contre, dans ses expériences portant sur des plantes inoculées avec *Bact. tumefaciens*, MAGROU trouve que le suc des parties saines de rameaux porteurs de tumeurs agglutine le germe homologue comme le suc des tumeurs elles-mêmes.

En résumé, malgré une préparation assez longue (3 mois) d'*Anthemis* et de *Clivia* avec une souche bactérienne agglutinogène et agglutinable qui a provoqué l'apparition de lésions caractéristiques, ces espèces végétales n'ont pas réagi à l'introduction d'antigène par l'élaboration d'agglutinines spécifiques.

De notre échec dans la mise en évidence d'agglutinines spécifiques chez *Begonia*, *Anthemis* et *Clivia*, nous ne prétendons pas déduire que les Végétaux sont incapables de réagir à l'introduction d'un antigène par des modifications humores. Les essais heureux d'immunisation végétale, que nous avons relatés dans la partie historique de ce travail, semblent nous autoriser, au contraire, à en admettre la possibilité. Des anticorps ont d'ailleurs été assez nettement mis en évidence dans quelques cas de symbiose.

Remarquons cependant que, exception faite d'un travail récent de MAGROU, aucun fait décrit dans la littérature ne démontre de façon absolue la formation d'agglutinines chez les Végétaux soumis à l'inoculation expérimentale de Bactéries.

Il est possible que les réactions humores des Végétaux soient très différentes de celles qu'on observe dans l'organisme animal et qu'une technique de recherche calquée sur la technique utilisée en sérologie soit impuissante à les déceler.

Conclusions générales

1° Le suc de Citron agglutine *B. pyocyaneus pyocyano-*
genes, *B. chlororaphis*, *B. prodigiosus*, *B. balticus*, *B. sub-*
tilis (Neisser), *B. subtilis* (Michigan), *B. subtilis* (Marburg).

2° *B. prodigiosus* n'est agglutiné par le suc de Citron que dans les systèmes riches en électrolytes (de conductibilité de l'ordre de celle de l'eau physiologique).

Cette concentration en électrolytes est également favorable à l'agglutination de *B. subtilis* (Neisser) et de *B. subtilis* (Michigan).

Par contre, *B. chlororaphis* et *B. subtilis* (Marburg) ne sont agglutinés par le suc de Citron que dans les systèmes pauvres en électrolytes.

Pour *B. balticus*, la concentration des systèmes en électrolytes n'influe pas sur la dilution limite d'agglutination.

3° On observe un parallélisme net entre les courbes de précipitation de *B. chlororaphis* par le suc de Citron, l'acide citrique et l'acide chlorhydrique, d'une part, entre les courbes de précipitation de *B. prodigiosus* par le suc de Citron et les solutions tampons « acide citrique + citrate de soude », d'autre part.

4° L'abaissement de l'acidité du suc de Citron à un pH de l'ordre de $\text{pH} = 6$ entraîne la disparition de son pouvoir agglutinant pour toutes les Bactéries expérimentées.

5° Le pouvoir agglutinant du suc de Citron n'est pas modifié par la filtration sur bougie Chamberland L.

6° Le chauffage du suc de Citron à 80° C. durant 40 minutes laisse intact son pouvoir agglutinant.

7° La réaction de saturation des agglutinines (réaction de

CASTELLANI) appliquée au suc de Citron n'abaisse son pouvoir agglutinant que dans la limite où elle détermine une diminution de son acidité.

8° Le suc de Citron ne renferme pas d'agglutinines normales pour les Bactéries expérimentées; son pouvoir agglutinant est dû à sa concentration élevée en ions H^+ .

9° L'inoculation à *Begonia* de *B. mori* et de *B. prodigiosus* ne détermine aucun symptôme de maladie.

10° Les corps bactériens de *B. prodigiosus* inoculés ne restent pas localisés dans les régions avoisinant les piqûres. Ils se répartissent dans le Végétal entier et s'y multiplient.

11° Le suc de *Begonia* non préparé agglutine *B. prodigiosus*, *B. mori* et *B. subtilis* (Marburg).

12° L'inoculation à *Begonia* de *B. mori*, d'une part, de *B. prodigiosus*, d'autre part, n'augmente pas le pouvoir agglutinant de son suc à l'égard de ces deux Bactéries.

13° Le suc de *Begonia* est acide: son pH est de l'ordre de $pH = 2,45 - 2,52$. Les systèmes formés d'une partie de suspension bactérienne et d'une partie de suc de *Begonia* dilué offrent un pH de l'ordre de $pH = 2,93$ (dilution 1/10) à $pH = 3,84 - 4,17$ (dilution 1/100).

14° L'abaissement de l'acidité du suc de *Begonia* inoculé ou non inoculé à un pH de l'ordre de $pH = 6,57$ fait disparaître son pouvoir agglutinant.

15° La réaction de saturation des agglutinines (réaction de CASTELLANI) appliquée au suc de *Begonia* abaisse son pouvoir agglutinant dans la limite où elle diminue sa concentration en ions H^+ .

16° Les plants de *Begonia* expérimentés n'ont pas réagi à l'inoculation de deux espèces bactériennes par la formation d'agglutinines spécifiques.

17° L'inoculation de *Bact. tumefaciens* à *Clivia miniata* a provoqué la formation d'indurations sur les feuilles et hampes florales.

18° Le suc des plants de *Clivia* inoculés avec *Bact. tume-*

faciens et extrait par pression des parties de feuilles et ham-pes florales voisines des points d'inoculation est dénué de pouvoir agglutinant à l'égard de cette Bactérie.

Le suc provenant des régions indurées de ces plants et extrait soit par pression, soit directement à la pipette est également dépourvu de pouvoir agglutinant à l'égard de *Bact. tumefaciens*.

19° Le suc des plants d'*Anthemis* inoculés avec *Bact. tumefaciens* n'agglutine pas cette Bactérie.

20° La non agglutination de *Bact. tumefaciens* par les sucs végétaux expérimentés n'est pas due à l'inagglutinabilité de la souche utilisée, car le sérum de Lapin préparé l'agglutine à la dilution limite de 1/2.000.

VU:

Nancy, le 3 décembre 1935.

Le Président de thèse,

Ph. LASSEUR.

VU ET APPROUVÉ:

Nancy, le 3 décembre 1935.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

PASTUREAU.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:

Nancy, le 4 décembre 1935.

Le Recteur de l'Académie,

L. BRUNTZ.

Président du Conseil de l'Université.

Index Bibliographique

- ARATA (M.). — Il meccanismo dell' immunità vegetali. (*Boll. Ist. Sier. Mil.*, XIV, 6, 7, 1935.)
- ARNAUDI (C.). — Sull' immunità acquisita nei vegetali. (*Atti Soc. It. Sc. Nat.*, 64, 1925, pp. 230-238.)
- ARNAUDI (C.). — A propos de quelques expériences sur l'immunité acquise des végétaux. (*Rev. Path. vég. et Entom. agric.*, 14, 1927, pp. 103-112.)
- ARNAUDI (C.). — Nuove esperienze sulle vaccinazione delle piante. (*Riv. Patol. veg.*, 18, 1928, pp. 161-168.)
- ARNAUDI (C.). — On vaccination of tobacco plant against « *Thiaviopsis basicola* ». (*Bull. Torrey Bot. Club*, LX, 1933, pp. 583-597.)
- BARTHEL (C.). — Contributions à la recherche des causes de la formation des bactéroides chez les bactéries des Légumineuses. (*Ann. Inst. Pasteur*, 35, 1921, pp. 634-647.)
- BEAUVIERIE (J.). — Essais d'immunisation des végétaux contre les maladies cryptogamiques. (*C. R. Acad. Sc.* 133, 1901, pp. 107-110.)
- BERNARD (Noël). — Recherches expérimentales sur les Orchidées. (*Rev. gén. de Bot.*, XVI, 1904, pp. 405-451, 458-476.)
- BERNARD (Noël). — Remarques sur l'immunité chez les plantes. (*Bull. Inst. Pasteur*, 9, 1909, pp. 369-386.)
- BERNARD (Noël). — Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydées. (*Ann. Sc. Nat. Bot.* 9^e série, 14, 1911, pp. 221-234.)
- BERRIDGE (E. M.). — Studies in bacteriosis XVI. The agglutinating and plasmolytic action of the sap of the potato on various parasitic and saprophytic species of bacteria. (*Ann. Appl. Biol.*, 16, 1929, pp. 567-577.)
- BORDET (J.). — Le mécanisme de l'agglutination. (*Ann. Inst. Pasteur*, 13, 1899, pp. 224-250.)
- BORDET (J.). — Traité de l'immunité. (*Masson, Paris*, 1920.)
- BOUTARIC (A.). — Les colloïdes et l'état colloïdal. (*Alcan, Paris*, 1931.)

- CAPPELLETTI (C.). — Reazioni immunitarie nei tubercoli radicali delle Leguminose. (*Giorn. Biol. e Med. Sperim.* 1, 1923, pp.117-180. — *Ann. di Bot.*, 16, 1924, pp. 171-186.)
- CAPPELLETTI (C.). — I tubercoli radicali delle Leguminose considerati nei loro rapporti immunitari e morfologici. (*Ann. di Bot.*, 17, 1928, pp. 211-297.)
- CARBONE (D.). — Studii sulle reazioni immunitarie delle piante. (*Boll. Ist. Sier. Milan.*, 2, 1922, pp. 261-265.)
- CARBONE (D.). — Risultati degli studii sulle reazioni immunitarie delle piante. (*Boll. Soc. Bot. Ital.*, 1925, pp. 63-71.)
- CARBONE (D.). — Ueber die aktive Immunisierung der Pflanzen. (*Centralbl. Bakt. Abt. II*, 76, 1929, pp. 428-437.)
- CARBONE (D.). — L'immunité chez les plantes. (*Congr. Intern. Microb. Paris*, 1930, pp. 627-634.)
- CARBONE (D.). — Sur la nature de la « barrière » chez le haricot vacciné et infecté par la « toile ». (*Boll. sez. ital. Soc. intern. Microb.*, 1934.)
- CARBONE (D.) et ALEXANDRI (Al.-V.). — Recherches sur les anticorps chez les végétaux. (*Boll. sez. ital. Soc. intern. Microb.* VII, 6, 1935, pp. 221-223.)
- CARBONE (D.) et ARATA (M.). — Sur le mécanisme de l'immunité acquise chez les plantes. (*Boll. sez. ital. Soc. intern. Microb.*, VI, 1934, pp. 219-226.)
- CARBONE (D.) et ARNAUDI (C.). — L'immunità nelle piante. (*Monogr. Ist. Siero. Milan.*, Milan, 1930.)
- CARBONE (D.) et FRANÇA (C.). — Studii sulle reazioni immunitarie delle piante. Esperienze col « *Drosophyllum lusitanicum* » (Link). (*Atti Soc. Lomb. Sc. Med. e Biol.*, 12, 1923, pp. 298-301.)
- CARBONE (D.) et JARACH (M.). — Sur le mécanisme de l'immunité acquise active chez les plantes. (*Boll. sez. ital. Soc. intern. Microb.*, 3, 1931, pp. 54-56.)
- CASTELLANI (A.). — Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren. (*Zeitschr. f. Hyg.*, 40, 1902, p. 1.)
- CHARRIN (A.). — Le Bacille pyocyanique chez les Végétaux. (*C. R. Acad. Sc.*, 116, 1893.)
- CHARRIN (A.) et ROGER (H.). — Note sur le développement des microbes pathogènes dans le sérum des animaux vaccinés. (*C. R. Soc. Biol.*, 41, 1889, p. 667.)
- CHARRIN (A.) et ROGER (H.). — Nouvelles recherches sur les propriétés microbicides du sérum. (*C. R. Soc. Biol.*, 2, *nouv. série*, 1890, p. 195.)

CHESTER (K.-S.). — Studies on the precipitin reaction in plants. I. The specificity of the normal precipitin reaction. (*Journ. Arnold Arbor.*, 13, 1932 a, pp. 52-74.)

II. Preliminary report on the nature of the « normal reaction ». *Id.*, 1932 b, pp. 285-296.)

CHESTER (K. S.). — The problem of acquired physiological immunity in plants. (*Quart. Rev. of Biol.*, VIII, 2 et 3, 1933, p. 74. *Trad. dans Boll. Ist. Sierot. Milan.*, XIII, 8, 11, 12, 1934.)

CHESTER (K. S.) et WHITAKER (T.-W.). — Studies on the precipitin reaction in plants. III. A biochemical analysis of the « normal precipitin reaction ». (*Journ. Arnold Arbor.*, 14, 1933, pp. 118-197.)

DOUSSAIN (Ch.). — Considérations sur l'immunité chez les végétaux. (*Rev. Path. comp.*, 25, 1925, pp. 73-75.)

DUPAIX (A.). — *B. caryocyanus* Beijerinck-Dupaix 1930. Recherches sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger. (*Paris, Le François*, 1933.)

EISLER (M.) et PORTHEIM (L.). — Ueber ein Hämagglutinin in Samen von *Datura*. (*Zeitsch. f. Immunitätsf.*, 1, 1908, pp. 151-160.)

EISLER (M.) et PORTHEIM (L.). — Ueber ein Hämagglutinin in Pflanzen. (*Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch.*, 29, 1911.)

EISLER (M.) et PORTHEIM (L.). — Ueber ein Hämagglutinin in Euphorbien. (*Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig.*, 66, 1912.)

EISLER (M.) et PORTHEIM (L.). — Weitere Untersuchungen über Hämagglutinin in Pflanzen. (*Zeitsch. f. Immunitätsf.*, 47, 1926, p. 59.)

ELLRODT. — Ueber das Eindringen von Bakterien in Pflanzen. (*Centralbl. f. Bakt., Abt. II*, 99, 1902, p. 639.)

FRÉMONT (Th.). — Recherche d'anticorps chez les Végétaux. (*C. R. Soc. Biol.*, CXII, 1933, p. 998.)

FRÉMONT (Th.). — Recherche d'anticorps chez les Végétaux. Présence d'une sensibilisatrice.

Nouvelle preuve de la présence d'un anticorps lysant chez les Végétaux par une méthode physiologique. (*C. R. Soc. Biol.*, CXIII, 1933, pp. 775-777.)

GHEORGHIU (I.). — L'immunité et la vaccinothérapie anticancéreuse chez les plantes. (*C. R. Soc. Biol.*, 109, 1932, p. 1387.)

GHEORGHIU (I.). — Le cancer des plantes et l'immunité anticancéreuse. (*Ann. Inst. Pasteur*, LI, 4, 1933, p. 535.)

GIOELLI (F.). — Alcune determinazioni refrattometriche in succhi di piante ammalate. (*Atti dell' Ist. Bot. Pavia*, 3 ser., 3, 1927, pp. 49-58.)

- HABERLANDT (G.). — Ueber Zellteilungshormone und ihre Beziehungen zur Wundheilung, usw. (*Biol. Zentralbl.*, 42, 1922.)
- HECHT (O.). — Ueber die Verwendung immunobiologischer Begriffe in Phytopathologie. (*Biol. Zentralbl.*, 51, 12, 1931.)
- HILTNER (L.) et STÖRMER (K.). — Neue Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Leguminosen und deren Erreger. (*Arb. Biol. Ab. f. Land. u. Forstwirtschaft. Am. K. Gesundheitsamte*, 3, 1903, pp. 151-307.)
- KALJAEV (A.-W.), KRAVTCHEKO (A.-T.) et SMIRNOVA (N.-I.). — Zum Problem der erworbenen Immunität bei Pflanzen. (*Jour. Microbiol. i. Immunol.*, XII, 1934.)
- KAULBERSZ-MARYNOWSKA (H.). — Notes sur la courbe de neutralisation et le coefficient-tampon de quelques fruits (citrons, oranges, pommes, bananes). (*Archiv. Phys. biol.*, X, 2, 1933.)
- KORINEK (J.). — Au sujet des agglutinines spécifiques chez les végétaux. (*Publicat. Facul. Sc. Univ. Charles, Prague*, 10, 1924.)
- KOSTOFF (D.). — Acquired immunity in plants. (*Genetics*, XIV, 1929, pp. 36-78.) D'après J. BEAUVERIE. — Un nouvel aspect de la question de l'immunité chez les plantes. La production d'anticorps de la nature des précipitines. (*Rev. Bot. appl. et Agric. tropic.*, IX, 93 et 94, 1929.)
- KOSTOFF (D.). — Induced immunity in plants by grafting. (*Congr. intern. microb. Paris*, 1930, pp. 642-644.)
- KOSTOFF (D.). — Studies on the acquired immunity in plants by grafting. (*Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 74, 1932, pp. 339-346.)
- KRAUS (R.), von PORTHEIM (L.) et YAMANOUCHI (T.). — Biologische Studien über Immunität bei Pflanzen. (*Ber. d. deutsch. bot. Gesellschaft*, XXV, 1907.)
- KRITCHEWSKY (J.-L.). — Ueber bakterielle Agglutinine und Präzipitine vegetabilischer Herkunft in Zusammenhange mit der Frage über die Fähigkeit der Pflanzen Immunitätskörper zu produzieren. (*Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 22, 1914, pp. 381-395.)
- KRITCHEWSKY (J.-L.). — Ueber die Eigenschaften bakterieller Agglutinine und Präzipitine vegetabilischer Herkunft. (*Zeitsch. f. Immunitätsf.*, 23, 1914, pp. 331-357.)
- KRUYT (H.-R.). — Les colloïdes (*Alcan, Paris*, 2^e édit., 1933.)
- LANDSTEINER (K.) et RAUBITSCHKE (M.). — Beobachtungen über Hämolysen und Hämagglutination. (*Centralbl. f. Bakt. Abt. I*, 45, 1908, pp. 660-667.)
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — Considérations générales sur le mécanisme de l'agglutination sérique des microbes. (*Trav. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy*, F. II, 1929, pp. 7-34.)

- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — Observations sur le mécanisme de l'agglutination sérique des microbes. (*Archiv. f. Microbiol.* I, 1, 1930, pp. 137-164.)
- LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (A.). — Observations sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. V, 1932, pp. 161-192.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et DOMBRAY (P.). — *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. IV, 1931.
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et RENAUX (M.-A.). — Variation de l'opacité des suspensions bactériennes en fonction du pH et de la nature des solutions modificatrices de la réaction du milieu. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. VII, 1934, pp. 153-169.)
- LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.) et RENAUX (M.-A.). — Action de la température sur l'agglutinine-*B. pyocyaneus*, l'agglutinine-*B. chlororaphis* et l'agglutinine-*B. caryocyaneus*. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. VII, 1934, pp. 219-221.)
- LASSEUR (Ph.), FRIBOURG (R.), DUPAIX (A.), LÉCAILLE (R.) et SERRA (J.). — Étude sur le mécanisme du phénomène de Charrin et Roger. Transport électrique des Bactéries et des Champignons. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. III, 1930, pp. 161-178.)
- LASSEUR (Ph.), MOREL (M.), DUPAIX (A.). — Variation de volume des plastides bactériennes dans l'agglutination par les ions H^+ , Al^{+++} et Fe^{+++} et le chauffage à $80^{\circ} C$. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. II, 1929, pp. 35-49.)
- LASSEUR (Ph.) et NOBLAT (A.-M.). — *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. I, 1928, pp. 63-85.
- LASSEUR (Ph.) et RENAUX (M.-A.). — Agglutination de différentes Bactéries par le suc de Citron. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. VII, 1934, pp. 171-191.)
- LASSEUR (Ph.) et RENAUX (M.-A.). — Agglutination de différentes Bactéries par le suc de Citron. (*C. R. Acad. Sc.*, 199, 24, 1934, p. 1454.)
- LASSEUR (Ph.) et RENAUX (M.-A.). — Recherche des agglutinines spécifiques chez quelques Végétaux. (*Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, F. VIII, 1935, pp. 93-107.)
- LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.), DUPAIX (A.) et COMBE. — *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. F. IV*, 1931.)
- LECOMTE DU NOÛY (P.). — Méthodes physiques en biologie et en médecine. (*Baillièrre et Fils, Paris*, 1933.)

- LEEMANN (A.-C.). — Problem of active plant immunity. (*Centralbl. f. Bakt.* II, 85, 1932, pp. 360-376.)
- MAGROU (J.). — L'immunité dans la symbiose. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1918.)
- MAGROU (J.). — Symbiose et tubérisation. (*Ann. Sc. Nat. Bot.*, 10^e série, 3, 1921.)
- MAGROU (J.). — L'immunité humorale chez les plantes. (*Rev. Path. vég. et Entom. agric.*, 1924.)
- MAGROU (J.). — A propos du pouvoir fungicide des tubercules d'Ophrydées. (*Ann. Sc. Nat.*, 10^e sér., 6, 1924.)
- MAGROU (J.). — Recherches expérimentales sur le cancer des plantes. (*Ann. Inst. Pasteur*, 38, 1924, pp. 851-872.)
- MAGROU (J.). — Le *Bacterium tumefaciens* dans les tissus du cancer des plantes. (*C. R. Acad. Sc.* 183, 1926, pp. 804-806.)
- MAGROU (J.). — Sur l'anatomie du cancer des plantes ou crown-gall. (*C. R. Acad. Sc.*, 183, 1926.)
- MAGROU (J.). — Recherches anatomiques et bactériologiques sur le cancer des plantes. (*Ann. Inst. Pasteur*, 41, 1927, pp. 785-801.)
- MAGROU (J.). — Réactions d'immunité des plantes vis-à-vis du *Bacterium tumefaciens*. (*C. R. Acad. Sc.*, 200, 3, 1935, pp. 256-258.)
- MALVOZ (E.). — Recherches sur l'agglutination du *Bacillus typhosus* par des substances chimiques. (*Ann. Inst. Pasteur*, XI, 1897, pp. 582-590.)
- MARCUSSEN-BEGUN (H.). — Untersuchungen über das Hämoagglutinin der Kartoffelknolle. (*Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 45, 1926, pp. 49-73.)
- MICHAELIS (L.). — Die Säureagglutination der Bakterien, insbesondere der Typhusbazillen. (*Deutsch. med. Wochenschr.*, 37, 1911, p. 969.)
- MORITZ (O.). — Zur Kritik der Phytoserologie. (*Biol. Zentralbl.*, 48, 1928, pp. 431-443.)
- NICOLLE (M.) et MAGROU (J.). — Les maladies parasitaires des plantes. (*Masson, Paris*, 1922.)
- NOBÉCOURT (P.). — Sur la production d'anticorps par les tubercules des Ophrydées. (*C. R. Acad. Sc.*, 77, 1923, pp. 1055-1057.)
- NOBÉCOURT (P.). — Contribution à l'étude de l'immunité chez les Végétaux. (*Barlier, Tunis*, 1928.)
- NOBÉCOURT (P.). — L'immunité chez les Végétaux. (*Assoc. fse. avanc. des Sc.*, 1933.)
- NOBLAT (A.-M.). — Observations sur le mécanisme de l'agglutination. Phénomène de Charrin et Roger. (*Thèse Pharm. Nancy*, 1929.)

- PASSALACQUA (T.). — Expériences de vaccination sur le « *Pelargonium zonale* ». (*Boll. del. sez. ital. Soc. intern. Microbiol.*, VI, 3, 1934.)
- PEETERS (P.). — L'agglutinine de *Phaseolus vulgaris*. (*C. R. Soc. Biol.*, 109, 1932, p. 555.)
- PICADO (C.). — Anticorps expérimentaux chez les Végétaux. (*Ann. Inst. Pasteur*, 35, 1921, pp. 893-901.)
- RAY (J.). — Les maladies cryptogamiques des Végétaux. (*Rev. gén. de Bot.*, XIII, 1901, pp. 145-151.)
- REDAELLI (P.). — Osservazioni su granulomi sperimentali da « *Phytonomas tumefaciens* » (Smith e Townsend) Bergey, nell *Stapelia*. (*Giorn. Batt. e Immun.*, XII, 6, 1934, p. 1161.)
- RIKER (A.-J.). — Studies on the influence of some environmental factors on the development of crown-gall. (*Jour. Agr. Res.*, 32, 1926, pp. 83-96.)
- SARDINA (J.-R.). — Zur Frage der Antikörperbildung bei Pflanzen. (*Angewandte Botanik*, VIII, 1926, pp. 289-303.)
- SCHNEIDER (E.-C.). — The haemagglutinating and precipitating properties of the bean (*Phaseolus*). (*Jour. Biol. Chem.*, II, 1912, pp. 47-59.)
- SCHIFF-GIORGINI. — Untersuchungen über die Tuberkelkrankheiten des Oelbaumes. (*Centralbl. f. Bakt. Abt. II*, XV, 1906.)
- SILBERSCHMIDT (K.). — Studien zum Nachweis von Antikörpern in Pflanzen. I. (*Planta*, 13, 1931, pp. 114-168.)
- SILBERSCHMIDT (K.). — Studien zum Nachweis von Antikörpern in Pflanzen. II. (*Planta*, 17, 1932, pp. 493-589.)
- SMITH (E.-F.). — Bacteria in relation to plant diseases. (*Carnegie Inst. Washington D. C.*, 2, 1911, pp. 93-94.)
- TOBLER (Fr.). — Untersuchungen und Betrachtungen über Immunität und Immunisierung im Pflanzenreich. (*Die Naturwissenschaften*, 19, 1931, pp. 413-416.)
- TOMASI (J.-A. De). — Immunity in plants. (*Phytopathology*, 22, 1932, pp. 95-102.)
- VIGLIANO (I.). — Sulla presenza nelle piante di sostanze agglutinanti, precepitanti, emolizzanti, ed antiemolitiche. (*Boll. dell. Ist. Sier. Milan*, 1922, pp. 267-274.)
- VISCO (G.). — Sur l'agglutination par le suc de citron. (*Boll. del sez. ital. Soc. intern. Microb.*, V, 5, 1933, pp. 136-139.)
- VUILLEMIN (P.). — Considérations générales sur les maladies des Végétaux. (*Tr. de Path. gén. de Bouchard*, T. I, Masson, Paris, 1895.)

- WAGNER (R.-J.). — Ueber bakterizide Stoffe in gesunden und kranken Pflanzen. (*Centralbl. f. Bakt. Abt. II*, 42, 1914, pp. 613-624.)
- WAGNER (R.-J.). — Wassertoffionen konzentration und natürliche Immunität der Pflanzen. (*Centralbl. f. Bakt. Abt. II*, 44, 1916, pp. 708-718.)
- WAKKER (J.-H.). — Contributions à la pathologie végétale. (*Arch. néérl. d. Sc. ex. et nat.*, XXIII, 1889.)
- YAMAHA (G.). — Notes sur la flocculation des suspensions de quelques Bactéries. (*Arch. Phys. biol.* X, 2, 1933.)
- ZIPFEL (H.). — Beiträge zur Morphologie und Biologie der Knöllchenbakterien der Leguminosen. (*Centralbl. f. Bakt. Abt. II*, 32, 1911, pp. 97-136.)
- ZOJA (A.). — L'immunità nelle piante. (*Atti Ist. Bot. Univ. Pavia*, 2, ser. 3, 1924, pp. 15-47.)
-

Table des Matières

	PAGES
AVANT-PROPOS.	9
INTRODUCTION.	11

PREMIÈRE PARTIE

Historique

CHAPITRE I

Quelques facteurs et réactions immunitaires chez les Végétaux.	21
--	----

CHAPITRE II

Essais d'immunisation des Végétaux.	27
---	----

CHAPITRE III

Les anticorps chez les Végétaux.	33
I. Anticorps normaux.	33
1) Propriétés agglutinantes ou lysantes à l'égard des hématies.	33
2) Propriétés précipitantes à l'égard des sérums et des extraits végétaux.	35
3) Propriétés antitoxiques à l'égard des sécrétions fongiques.	37
4) Propriétés agglutinantes à l'égard des Bactéries ou précipitantes à l'égard des extraits bactériens.	37
II. Anticorps apparaissant chez les Végétaux à la suite de l'infection expérimentale.	41
1) Formation d'anticorps dans les associations symbiotiques.	41
2) Formation d'anticorps dans les affections spontanées ou expérimentales.	46
3) Formation d'anticorps par inoculation de Bactéries non phytopathogènes.	51
4) Formation d'anticorps par introduction d'antigènes divers.	56
5) Formation d'anticorps par greffe.	58

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles

CHAPITRE I

Agglutination de différentes Bactéries par le suc de Citron.....	65
Généralités.	65
Technique.	67
Résultats expérimentaux.	72

CHAPITRE II

Recherche d'agglutinines spécifiques chez quelques Végétaux....	95
Généralités.	95
Technique.	96
Résultats expérimentaux	100
1) Essais effectués avec <i>Begonia</i>	100
2) Essais effectués avec <i>Anthemis</i> et <i>Clivia</i>	109
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	113
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	117
